

**Radioimmunologische Follitropin (FSH)-Bestimmungen
beim Rind – methodische Entwicklungsarbeiten und
physiologische Ergebnisse**

Edgar Schallenberg

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

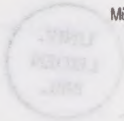
https://archive.org/details/IA41555616_0020

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weißenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Prof. Dr. Heinrich Karg

Radioimmunologische Follitropin (FSH)-Bestimmungen
beim Rind - methodische Entwicklungsarbeiten und
physiologische Ergebnisse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von

Edgar Schallenger

aus

Wildberg

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. H. Karg
Korreferent: Prof. Dr. W. Leidl

Tag der Promotion: 25.2.1977



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen, Nomenklatur	IV
Vorbemerkung	1
1. Literatur	2
1.1. FSH als selbständiges gonadotropes Hormon im Hypophysenvorderlappen	2
1.1.1. Historische Betrachtung	2
1.1.2. Chemische Struktur	3
1.1.3. Physikalisch-chemische Eigenschaften	6
1.2. Regulation der FSH-Sekretion	11
1.2.1. Morphologische Beziehungen	11
1.2.2. Gonadoliberin	12
1.2.3. Rückkopplungsmechanismen	15
1.3. Episodische und periodische FSH-Sekretion	19
1.4. Vorkommen und physiologische Wirkungen von FSH	20
1.4.1. Pubertät	20
1.4.2. Brunstzyklus, Follikelwachstum und Ovulation	22
1.4.3. Trächtigkeit, Geburt und post-partum-Periode	25
1.5. Biotechnische und medikamentelle Manipulationen	26
1.5.1. Releasinghormone	26
1.5.2. Superovulation	29
1.5.3. Prostaglandine und Prostaglandin-Analoga	29
1.5.4. Prolaktin-Hemmung durch 2-Br- α -Ergokryptin-Methan-sulfonat	30

	Seite
2. Methodik der FSH-Bestimmung	31
2.1. Steelman-Pohley-Biotest	31
2.2. Radioimmunotest (RIT)	34
2.2.1. Prinzip	34
2.2.2. Puffer und Chemikalien	36
2.2.3. FSH-Präparationen	38
2.2.4. Antisera gegen FSH	39
2.2.5. Präzipitierender (2.) Antikörper	43
2.2.6. Radioaktive Markierung von FSH	43
2.2.6.1. Chloramin-T-Methode	43
2.2.6.2. Enzymatische Methoden	45
2.2.7. Reinigung und Charakteristik des radioaktiv markierten FSH	47
2.2.7.1. Gelfiltration (1. Reinigung, Entsalzen)	47
2.2.7.2. Papierelektrophorese des eluierten organischen "Peaks"	47
2.2.7.3. 2. Reinigung über Zellulose-Säule	49
2.2.7.4. Lagerungsprobleme	49
2.2.7.5. Kennwerte nach Markierung (Berechnungsbeispiele)	52
2.2.8. Endpunktbestimmung	55
2.2.9. Computerisierte Testauswertung	56
2.2.10. Gültigkeitskriterien	56
2.2.10.1. Testgenauigkeit, "Intra-assay"-Variation	56
2.2.10.2. Reproduzierbarkeit, "Inter-assay"-Variation	59
2.2.10.3. Wiederfindung von zugesetztem FSH	59
2.2.10.4. Parallele Reaktion von endogenem und exogenem FSH	62

	Seite
3.	Physiologische Ergebnisse 63
3.1.	Versuchstiere, Blutproben, durchgeführte Versuche 63
3.2.	Bestimmung der biologischen Halbwertszeit (HWZ) 64
3.3.	Diurnale bzw. episodische Sekretion 67
3.4.	Pubertätsversuche bei männlichen Tieren 73
3.5.	Pubertätsversuche bei weiblichen Tieren 80
3.6.	Brunstzyklus 83
3.7.	Trächtigkeit, Geburt, post-partum-Periode 90
3.8.	Futterentzug bei 2 weiblichen Tieren 97
3.9.	Kastration bei einem männlichen Kalb 99
3.10.	Einfluß von Steroidhormonen 99
3.11.	Versuche mit Gonadoliberin (GnRH) und einem Gonadoliberin-Analog 104
3.12.	Versuche mit Thyroliberin (TRH) 129
3.13.	Versuche zur Superovulation mit PMSG 129
3.14.	Versuche mit einem Prostaglandin- $F_{2\alpha}$ -Analog 132
3.15.	Versuche mit 2-Br- α -Ergokryptin-Methansulfonat 132
4.	Diskussion 134
4.1.	Diskussion der methodischen Entwicklungsarbeiten 134
4.2.	Diskussion der physiologischen Ergebnisse 134
5.	Zusammenfassung - Summary 140
6.	Literaturverzeichnis 146
7.	Tabellenanhang 204

ABKÜRZUNGEN, NOMENKLATUR

CB 154	2-Br- χ -Ergokryptin-Methansulfonat
C.l.	Corpus luteum
FSH	Follitropin, Follikelstimulierendes Hormon
FSH-RH	Folliliberin, Follikelstimulierendes Hormon-Releasing Hormon
GH, STH	Growth hormone, Somatotropes Hormon, Wachstumshormon
Gn-RH, GnRH	Gonadoliberin, Gonadotropin-Releasing Hormon
HCG, hCG	Human Chorionic Gonadotropin
HMG	Human menopauseal gonadotropin
HVL	Hypophysenvorderlappen
HHL	Hypophysenhinterlappen
HWZ	Halbwertszeit
I, ¹²⁵ I, J, ¹²⁵ J	Jod, radioaktiv markiertes Jodisotop ¹²⁵
I.E., I.U.	Internationale Einheit, International unit
IEP	Isoelektrischer Punkt
IF	Inhibitor Faktor
IRP	Internationales Referenz Präparat
LH	Lutropin, Luteinisierungshormon
LH-RH, LRH	Luliberin, Luteinisierungshormon-Releasing Hormon
LH/FSH-RH	Luteinisierungshormon-Releasing Hormon/ Follikelstimulierendes Hormon-Releasing Hormon
LPD	Lactoperoxidase
NIH, NIAMD	National Institutes of Health
OAAD	Ovaric ascorbic acid depletion assay
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropin
RF	Releasing Faktor
RIA, RIT	Radioimmunoassay, Radioimmunotest

RRT	Radioligend Rezeptor Test
TRH, TSH-RH	Thyroliberin, TSH-Releasing Hormon
TSH	Thyrotropin, Thyreoidea stimulierendes Hormon

Bemerkung zur Nomenklatur:

In dieser Arbeit werden die von der internationalen Kommission für biochemische Nomenklatur (IUPAC - IUB - CEN) vorgeschlagenen Vereinheitlichungen für die Nomenklatur von Proteinhormonen, Releasing Hormonen und Release-Inhibiting-Faktoren (The Endocrine Society 1975) verwendet, die die gebräuchlichen Trivialnamen ablösen sollen. Bisher wurde das gonadotrope Hormon Follicitropin (FSH) als Follikelstimulierendes Hormon und früher auch als Prolan A bezeichnet.

VORBEMERKUNG

Das Wissen über Gonadotropine als Schlüsselhormone im Ablauf der Steuerung der männlichen und weiblichen Fortpflanzung hat in den letzten Jahren seit Einführung radioimmunologischer Meßverfahren eine immense Ausweitung erfahren. Im Gegensatz zu anderen Spezies war die Einsicht in die Regulation der Sexualabläufe beim Rind wesentlich erschwert, da sich bisher das gonadotrope Hormon Follicitropin nur mit biologischen Bestimmungsverfahren in Hypophysenextrakten, nicht jedoch im Blut, nachweisen ließ.

Bisher waren für diese Spezies radioimmunologische Bestimmungen unter anderem für das Lutropin (LH), für Progesteron und für Östrogene entwickelt worden. Aufgabe vorliegender Arbeit war es, einen gut reproduzierbaren, hochspezifischen und routinemäßig einsetzbaren Nachweis für FSH zu entwickeln. Damit konnte dann eine Bestandsaufnahme physiologischer Daten während verschiedener fortpflanzungsbiologisch besonders interessanter Perioden beim männlichen und weiblichen Rind erstellt werden. Zusätzlich wurden Hinweise über FSH-Reaktionen während verschiedener biotechnischer Manipulationen, die Verbesserungen in der Veterinärmedizin bzw. tierischen Produktion bringen sollen, gewonnen.

1. LITERATUR

1.1. FSH als selbständiges gonadotropes Hormon im Hypophysenvorderlappen

1.1.1. Historische Betrachtung

Die Kenntnisse über die Steuerung der tierischen und menschlichen Fortpflanzung blieben mehr als 2500 Jahre nahezu unverändert auf dem Stand, den Hippokrates und Aristoteles markiert hatten. Erst der Göttinger Anatom Berthold leitete 1849 aus Hodentransplantationen an Hühnern eine spezifische Wirkungsübertragung auf dem Blutwege auf die Erfolgsorgane ab. Solange die Zusammenhänge zwischen den Abläufen am Ovar, an den akzessorischen Geschlechtsorganen und den übergeordneten Steuerungszentren noch nicht erkannt worden waren (siehe Fraenkel 1903), konnten keine Erklärungsversuche insbesondere des weiblichen Fortpflanzungsgeschehens gemacht werden. Versuche mit Hypophysektomie (Cushing et al. 1910) und Hypophysenimplantaten (Evans und Long 1921 und 1922) sowie Untersuchungen über den Zyklus von Labortieren (Stockard und Papanicolaou 1917, Long und Evans 1922, Allen und Doisy 1923) wiesen auf Einflüsse durch die Hypophyse hin. Erkenntnisse über Ovarial- und Hypophysenvorderlappenhormone (Zondek und Aschheim 1927, Aschheim und Zondek 1927 und 1928 a, b) verdeutlichten erst die übergeordnete Stellung des Hypophysenvorderlappens als "Motor der Sexualfunktion". Über die Wirkung eines die Gonaden stimulierenden Hormons berichteten Fevold et al. 1930, Zondek 1930 a, b beschrieb die zwei getrennten Bestandteile des im HVL produzierten "Sexualhormons": das Follikelreifungshormon (Prolan A) und das Luteinisierungshormon (Prolan B).

Den geringen Gehalt der Hypophysen vom Rind an gonadenstimulierendem Hormon im Vergleich zu Schaf und Pferd bestimmten Wallen-Lawrence und van Dyke 1931, Evans et al. 1933 und Chance et al. 1939. Bates et al. 1935 stellten keinen signifikanten Unterschied in den FSH-Konzentrationen bei Rinder-Embryos, Kälbern, Ochsen, Bullen und Kühen fest, wohingegen Evans und Simpson 1929 bei frühträchtigen Kühen den FSH-Gehalt erhöht fanden.

1.1.2. Chemische Struktur

FSH ist wie LH und TSH ein Glykoprotein, d.h. Oligosaccharidanteile sind über kovalente Bindungen an Proteine gekoppelt. Diese Proteohormone sind aufgrund von Aminosäuresequenzunterschieden in der Primärstruktur in hohem Maße artspezifisch. Die Darstellung gerade des FSH gestaltete sich wegen Instabilität und schneller Inaktivierung während der Isolierung besonders schwierig (Li 1972). Bisher liegen noch keine endgültigen Strukturanalysen von FSH aus Tierhypophysen vor, deshalb müssen noch lückenhafte Einzelkenntnisse für Erklärungsversuche zusammengefügt werden.

"Subunits"

Hinweise auf den Aufbau ovinen FSH's aus zwei unterschiedlichen Ketten geben die verschiedenen Sedimentationskonstanten in 0,1 M NaHCO_3 (3,02 S) und bei pH 1,3 (1,54 S). In Analogie zur Darstellung der TSH-Subunits (Liao und Pierce 1970) konnten auch für ovines FSH die α - und die β -Subunit gewonnen werden (Papkoff und Ekblad 1970). FSH- β weist einen Kohlenhydratanteil von etwa 25 % gegenüber 6 % von FSH- α auf; der Aminosäureanteil ist bei beiden ziemlich gleich, aber es bestehen signifikante Unterschiede im Gehalt an Lysin, Threonin, Cystin und Leucin.

Beide Subunits weisen einzeln im Steelman-Pohley-Test gegenüber der hochgereinigten Ausgangssubstanz (Aktivität $37,2 \times \text{NIH-FSH-S}_1$) nur eine sehr geringe biologische Aktivität auf (FSH- α ca. $2,4 \times \text{NIH-FSH-S}_1$, FSH- β ca. $4,7 \times \text{NIH-FSH-S}_1$). Werden die beiden Teile wieder rekombiniert, erhält man in diesem Beispiel eine Aktivität von 15,2, wird die FSH- α -Kette durch die LH- α -Kette ersetzt, so gewinnt man sogar ein Produkt mit der Aktivität von $17,6 \times \text{NIH-FSH-S}_1$ (Papkoff 1971).

Diese Beobachtungen unterstreichen die Vermutung, daß die FSH- β -Kette die für die hormonspezifische Wirkung determinierende ist und die α -Kette eine allen Glykoproteidhormonen gemeinsame Struktureinheit darstellt (Pierce et al. 1971). Die volle Aktivität kann stets nur die Einheit von α - und β -Kette bewirken. Über gewisse Struktur-

homologien zwischen der FSH- α - und der LH- α -Kette jeweils beim Schaf berichten Licht und Papkoff 1971.

Angaben über die Subunits von Rinder-FSH liegen nicht vor, vergleichend interessant sind die Angaben über Pferde-FSH von Landefeld und McShan 1974: das Molekulargewicht beider Ketten ist annähernd gleich bei ca. 16 000, die β -Untereinheit enthält einen um 5 % höheren Kohlenhydratanteil. Sie stellten eine große Ähnlichkeit zwischen human FSH- α , hCG- α und equinem FSH- α fest. Shome und Parlow 1974 a, b analysierten als erste die Sequenzen der human-FSH-Untereinheiten: hFSH- α ist aus 89 Aminosäuren aufgebaut mit zwei Kohlenhydrat-Anteilen, die an Asparaginsäure in den Positionen 49 und 75 gebunden sind; diese Subunit ist mit human-LH- α identisch, aber unterscheidet sich in 29 Positionen von Schaf-LH- α .

hFSH- β besteht aus 115 Aminosäuren-Anteilen, zwei Kohlenhydratketten sind in den Positionen 7 und 24 wiederum an Asparagin-Säure gebunden. Dieses FSH- β hat 49 identische Positionen mit human TSH- β und 39 übereinstimmende Aminosäurenpositionen mit human LH- β , zeigt also eine größere Übereinstimmung mit der hormonspezifischen β -Kette von TSH als mit der des zweiten Gonadotropins LH.

Biologische Aktivitäten von human FSH-Subunits von weniger als 1 % (FSH- α) und 2 - 10 % (FSH- β) der Aktivität des Gesamtmoleküls fanden Shownkeen et al. 1976.

Li 1972 stellte eine Hypothese über eine mögliche Veränderung der Glykoproteidhormone während der Phylogenese auf. Alle drei sind aus α - und β -Subunits aufgebaut, zusätzlich sind LH- α und TSH- α bei nahe identisch und FSH- α wohl zumindest ähnlich. Da sich bei Versuchen an Eidechsen, also phylogenetisch älteren Tieren (Licht und Papkoff 1971) FSH weit wirksamer als LH erwiesen hat, könnte vermutet werden, daß ein "Urmolekül" der Glykoproteidhormone wohl eng verwandt mit FSH- α gewesen sein dürfte (siehe Abbildung 1).

Pleomorphismus des FSH-Moleküls

Bogdanove et al. 1974 und 1975 berichten über qualitative Veränderungen des FSH-Moleküls (bei Ratten): unter Androgeneinfluß wird

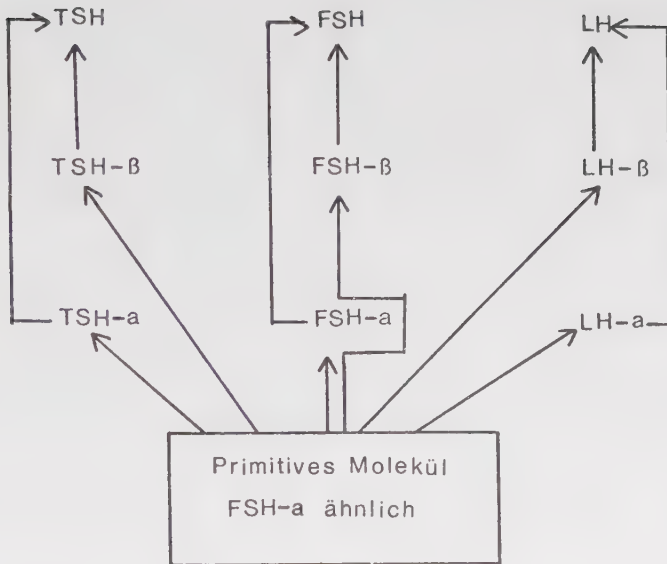


Abbildung 1:

Mögliche Evolution der Glykoproteidhormone
(nach Li 1972)

ein sog. "Andro"-FSH mit verzögerter "Metabolic-clearance-rate" von der Hypophyse freigesetzt gegenüber einem "Neuter-FSH" bei kastrierten Tieren. Ovarsteroido ändern das FSH in Richtung eines Moleküls mit relativ schnellerer "Metabolic-clearance-rate", einem "Gyno"-FSH mit offensichtlich geringerem Molekulargewicht. Gleichzeitig ergibt sich eine Änderung des Verhaltens dieser 3 verschiedenen FSH-Moleküle im biologischen und immunologischen Test. Eine Verdeutlichung dieser Verhältnisse soll Abbildung 2 geben. Hinweise unterschiedlicher molekularer Charakteristika von FSH beim Affen finden sich auch bei Knobil et al. 1972 und Peckham et al. 1973. Vermutungen, daß vielleicht die biologische Potenz von FSH bei Schafen nach Behandlung mit GnRH (-Analoga) unterschiedlich sein könnte, ohne daß sich das in den im peripheren Blut gemessenen FSH-Konzentrationen ausdrückt, äußern Kinder et al. 1976. Sie beobachteten nach Verabreichung verschiedener Releasinghormon-Präparationen an weibliche Schafe auffallend unterschiedliche Ovulationsraten, konnten dabei aber keine Veränderungen der FSH-Werte im Blutplasma feststellen.

1.1.3. Physikalisch-chemische Eigenschaften

Ein signifikanter Unterschied zwischen FSH und TSH oder LH besteht wohl im relativ hohen Gehalt an Sialinsäure (einer N-Acetylneuraminsäure) im Follitropinmolekül aller bisher untersuchten Spezies, insbesondere aber beim Menschen, was für die biologische (Pierce 1973), aber teilweise auch für die immunologische Aktivität (Ross et al. 1972) bestimmend zu sein scheint. Der Sialinsäure-Anteil liegt immer mit α -keto-Bindung als endständige Gruppierung vor. Wird mit dem Enzym α -Neuraminidase die Sialinsäure vom Protein abgespalten (Papkoff 1965), dann verliert z.B. eine Schaf-FSH-Präparation (NIH-FSH-S₁) 97 % ihrer biologischen Aktivität (Gottschalk et al. 1960).

Bisher gelang die Isolierung und Reinigung von FSH aus Hypophysen vom Menschen (Papkoff et al. 1967, Saxena und Rathnam 1967, Reichert et al. 1968) und vieler landwirtschaftlicher Nutztiere, wie dem Schaf

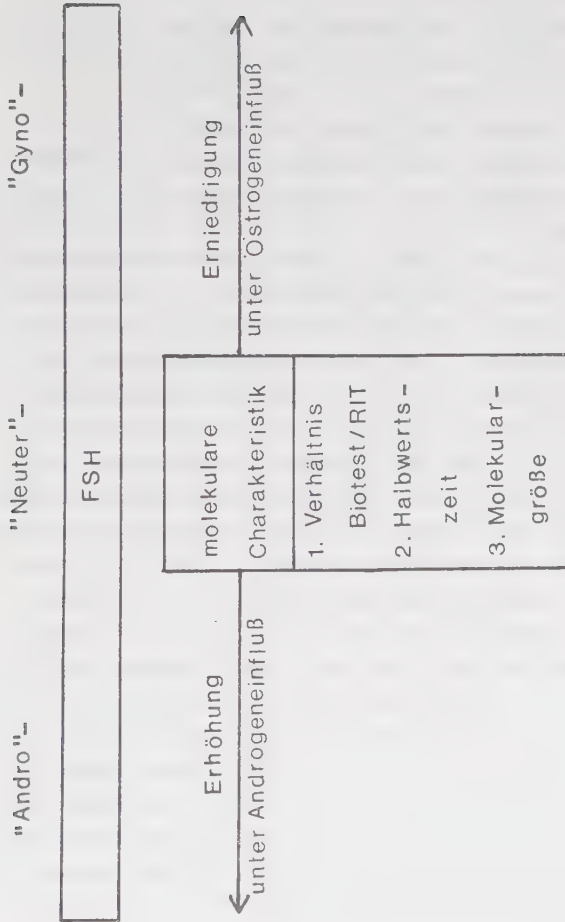


Abbildung 2:
Pleomorphismus des FSH-Moleküls (nach Bogdanove et al. 1975)

(Papkoff et al. 1967, Cahill et al. 1968), dem Rind (Reichert und Jiang 1965) und dem Pferd (Stockell Hartree et al. 1968, Braselton und McShan 1970, Nuti et al. 1972), aber auch bei Laboratoriumstieren, wie der Ratte (Reichert und Midgley 1968) oder dem Rhesusaffen (Shownkeen et al. 1973).

Natives ovines FSH soll ein Molekulargewicht von etwa 25 000 (Papkoff et al. 1967), 32 000 (Cahill et al. 1967) bis 33 000 (Hashimoto et al. 1965, Sherwood et al. 1969) aufweisen.

Für human-FSH existieren höhere Angaben von 36 000 bis 41 000 (Roos 1968, Ryan et al. 1971), teilweise wohl bedingt durch unterschiedliche Bestimmungsmethoden (Osmometrie, Diskelektrophorese, Ultrazentrifugation).

Über die Aminosäurezusammensetzung einer Rinder-FSH-Präparation (Fontaine 1969), dreier Schaf-FSH-Präparationen (Sherwood et al. 1970, de la Llosa 1972 und Papkoff und Ekblad 1970), einer equinen FSH-Präparation (Nuti et al. 1972) und von human-FSH (Shome und Parlow 1974 a), gibt Tabelle 1 Auskunft. Die Aminosäureanzahl von tierischem FSH ist noch unbekannt, doch dürfte sie wohl auch in dem Bereich von LH (216) und TSH (205) liegen; human-FSH besteht aus 204 Aminosäuren (Shome und Parlow 1974 a, b). Tryptophan wurde wegen stark schwankender Angaben nicht in die Tabelle aufgenommen, scheint aber stets vorhanden zu sein. Nach Ekblad et al. 1970

scheinen 25 - 30 % der Aminosäuren bei Schaf-FSH in der α -Helix-Konfiguration angeordnet zu sein. Cahill et al. 1968 und Papkoff 1971 machen zusätzliche Angaben zur Kohlenhydratzusammensetzung und zu den physikalisch-chemischen Konstanten von Schaf-FSH (siehe Tabelle 2, vergleichend mit equinem FSH). Reichert 1971 bestimmte einen isoelektrischen Punkt (IEP) einer ovinen FSH-Präparation (mit einer biologischen Aktivität von 40 Einheiten/mg) von 4,72 und einer bovinen Präparation (mit einer Aktivität von 1,6 Einheiten/mg) von 4,68, im Gegensatz dazu wurde der IEP von human-FSH von Rathnam und Saxena mit 4,25 und von Bettendorff et al. 1968 mit 3,0 angegeben, also niedriger als bei Rind und Schaf.

Tabelle 1:

Aminosäuregehalte von bovinem, ovinem, equinem und human-FSH
(Mole Aminosäurenanteile/100 Aminosäuren); modifiziert nach
Pierce 1973:

Aminosäure	bovin (1)*	ovin (2)*	ovin (3)*	ovin (4)*	equin (5)*	human (6)*
Lysin	7,5	8,5	8,3	8,6	11,7	6,1
Histidin	3,5	3,0	2,8	3,1	5,1	2,7
Arginin	3,5	3,9	3,5	4,2	7,4	3,8
Asparaginsäure	9,0	8,3	9,0	9,7	13,2	7,6
Threonin	8,6	10,2	7,6	7,3	16,5	9,2
Serin	6,2	6,2	7,6	6,1	10,5	6,7
Glutaminsäure	10,4	8,9	10,4	11,3	14,4	10,0
Prolin	6,9	5,9	6,9	5,9	12,7	6,1
Glyzin	9,0	4,6	5,5	5,2	9,4	5,5
Alanin	10,4	6,8	7,6	7,8	10,0	6,9
Cystein	5,2	10,2	4,1	6,1	17,0	9,1
Valin	6,2	6,2	5,5	6,7	13,5	6,5
Methionin	1,4	1,9	1,4	1,1	2,2	1,7
Isoleucin	3,5	4,1	4,1	3,1	7,9	3,6
Leucin	5,5	4,0	7,6	7,3	9,1	5,4
Tyrosin	2,8	4,9	4,1	3,3	8,1	5,2
Phenylalanin	3,1	2,6	4,1	4,1	8,6	3,8

- * (1) Fontaine 1969
(2) Sherwood et al. 1970
(3) De la Llosa 1972
(4) Papkoff und Ekblad 1970
(5) Nuti et al. 1972
(6) Shome und Parlow 1974 a

Tabelle 2:

Kohlenhydratanteil und physikalisch-chemische Charakterisierung
von Schaf-FSH im Vergleich zu Pferde-FSH;

	ovin (1)*	ovin (2)*	equin (3)*
Kohlenhydratanteil		18,0 %	
Hexosen (gesamt)	9,7 %	7,0 %	9,3 %
Mannose	3,1 %		
Galaktose	3,6 %		
Hexosamine (gesamt)	4,5 %	6,8 %	9,1 %
Glukosamine	3,1 %		6,5 %
Galaktosamine	1,4 %		1,5 %
Fruktose	0,6 %	1,0 %	
Sialinsäure	5,4 %	3,4 %	4,7 %
Molekulargewicht	32 000	32 000	33 200
Isoelektrischer Punkt	5,0	4,8	
Sedimentationskoeffizient $s_{20,w}^0 \times 10^{-13}$	3,5 S		
0,1 M NaHCO ₃		3,02 S	
pH 1,3 (HCl-NaCl)		1,54 S	
biologische Aktivität ($\times$ NIH-FSH-S ₁)	43		103
NH ₂ -terminale	Asparagin	Phenylalanin	Phenylalanin
Amino- säuren		Glyzin	Asparagins.
COOH-terminale	Leucin	Serin Leucin	Isoleucin Glutaminsäure

* (1) Nuti et al. 1972

(2) Cahill et al. 1968

(3) Papkoff 1971

Bovines Hypophysen-FSH ist ganz besonders wenig widerstandsfähig gegenüber Extraktions- und Reinigungsversuchen (Reichert 1967). Es ist deshalb wohl nur bedingt möglich, aus dem Verhalten des relativ gut untersuchten Schaf-FSH auf Rinder-FSH zu schließen.

1.2. Regulation der FSH-Sekretion

1.2.1. Morphologische Beziehungen

Der Hypothalamus mit seiner Vielzahl von strukturell und funktionell unterschiedlichen Zellgruppen stellt ein wichtiges Glied im zentral-nervösen Steuerungssystem dar. Ein "Sexualzentrum" im Zentralnervensystem vermuteten schon 1932 Hohlweg und Junkmann. Im Zentralnervensystem erfolgt eine Koordination des gesamten Fortpflanzungsgeschehens.

Der mediobasale Bereich des Hypothalamus (Eminentia mediana und Nucleus ventromedialis) soll für die "tonische" Sekretion der Gonadotropine (mehr männlicher Sekretionstyp) verantwortlich sein, die übergeordnete präoptische Region soll die Schaltstelle des mehr weiblichen Gonadotropin-Sekretionstyps darstellen ("zyklisches Zentrum, Nalbandov 1976, siehe auch Abbildung 5).

Durch Elektrostimulationsversuche an Rattenhypothalami konnten Chappel und Barraclough 1976 erstmals ein separates zyklisches Zentrum für die FSH-Sekretion in der medialen präoptischen Region nachweisen, zusätzlich konnten sie aufzeigen, daß selektive unilaterale Stimulation dorsaler anteriorer hypothalamischer Regionen eine hohe FSH-Freisetzung bewirkte.

Hier laufen Informationen aus einer Vielzahl übergeordneter Hirnstrukturen zusammen, die morphologisch und funktionell in enger Beziehung zueinander stehen wie Amygdala, Hippocampus und Mesencephalon, die unter dem Begriff "Limbic-midbrain-circuit" zusammengefaßt werden (Nauta 1960). Auch Cortex und Septum beeinflussen die komplexen Abläufe; die Funktionswege und Funktionsmechanismen visueller, taktiler, olfaktorischer, thermischer (Davidson et al. 1969) und akustischer Reize, die massiv gerade am Sexualverhalten beteiligt sind, sind kaum

aufgeklärt. Die anatomischen Lagebeziehungen und die unterschiedlichen Konzentrationen von Releasing-Faktoren, biogenen Aminen und Enzymen, die in Neurotransmitterfunktionen eingreifen, bestimmten Kizer et al. 1976 an Serienschnitten der Eminentia mediana beim Rind.

Einen Überblick über die ungefähren Lagebeziehungen zur nachgeordneten Hypophyse (durchschnittliches Gewicht beim Rind 1,5 - 3,0 g nach Döcke 1975) gibt Abbildung 3. Die funktionellen Beziehungen zwischen bestimmten Regionen des Hypothalamus und der Adenohypophyse bei verschiedenen Spezies soll Abbildung 4 veranschaulichen.

Lokalisierung der Hormonsekretion im HVL:

Die chromophobe Zelle des Hypophysenvorderlappens gilt als der multipotentielle Vorläufer der beiden anderen Hauptzellarten, der azidophilen und der basophilen Zellen, welche Sekretionsgranula enthalten können, die als Speicherformen von Hormonen angesehen werden. Die basophilen Zellen, bestehend aus Beta- und Delta-Formen, sollen für die Sekretion der Gonadotropine verantwortlich sein. FSH und LH können nur von den basophilen Deltazellen sezerniert werden, die hauptsächlich im Zentrum der Adenohypophyse rund um Blutgefäße angeordnet sind (McDonald 1971, Tepperman 1972).

1.2.2. Gonadoliberin

McCann et al. bewiesen 1960 die Existenz eines Neurchormons, das LH aus dem Hypophysenvorderlappen der Ratte freisetzen konnte: nach Verabreichung von Hypothalamus-Extrakten an juvenile Ratten beobachteten sie einen LH-Anstieg im Blut. Aber erst Schally et al. 1971 a konnten aus Schweinehypothalami eine Substanz zu isolieren, die wiederum bei der Ratte die Freisetzung beider Gonadotropine, von LH und FSH, stimulierte; Matsuo et al. 1971 a und Baba et al. 1971 gelang die Strukturaufklärung dieser Verbindung, einem Dekapeptid (10 Aminosäuren) mit einem Molekulargewicht von 1181. Die Synthese dieser Verbindung gelang ebenfalls Matsuo et al. 1971 b, Geiger et al. 1971 und Rivaille et al. 1971. Die Existenz eines getrennten FSH-RH im

Schematische Darstellung des „Limbic-Midbrain“-POA-, Hypothalamus- und Hypophysensystems. AC = Commissura anterior; AMY = Amygdala; ARC = Nucleus arcuatus; DHPC = Dorsaler Hippocampus; MM = Mamillarkörper; NSO = Nucleus supraopticus; POA = Präoptische Region (Area); PVN = Nucleus paraventricularis; SCH = Nucleus suprachiasmaticus; ST = Stria terminalis; VHPC = Ventraler Hippocampus; VMH = Nucleus ventromedialis hypothalami; (1) = Mediales Vorderhirnbündel

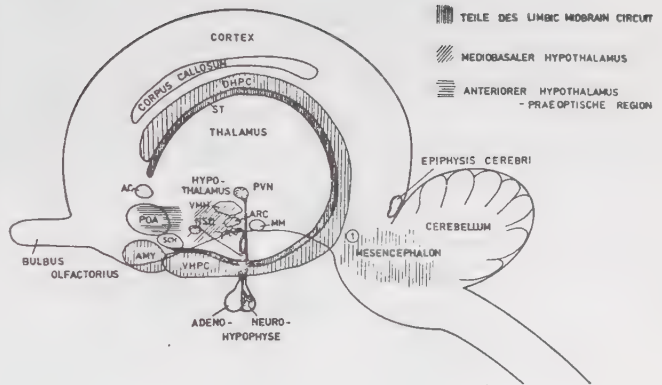


Abbildung 3:

Schematische Darstellung der Beziehungen von "Limbic-midbrain"- und Präopticus-Region mit dem Hypothalamus- und Hypophysensystem (aus Pervizi und Ellendorff 1974)

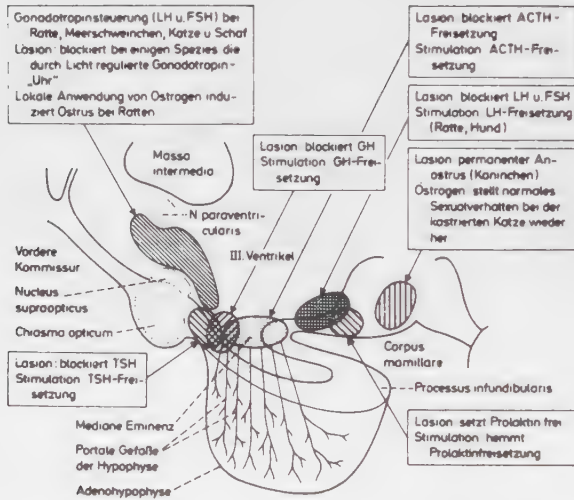


Abbildung 4:

Funktionelle Beziehungen zwischen Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen (aus Teppermann 1972, nach Ganong 1959 und Sawyer und Kawakami 1961)

Hypothalamus wollten Currie et al. 1973 zeigen, die gleiche Arbeitsgruppe (Gunnar Johansson et al. 1973) beschrieb eine mögliche "in-vitro" Biosynthese. Auch Bowers et al. 1973 vermuteten eine Freisetzung von FSH und LH nach Hypophysenstimulierung durch getrennte Releasing-Faktoren, einem FSH-RH und einem LH-RH.

Hinweise für einen möglichen unterschiedlichen "Release" bei Ratten stellten 1965 Dhariwal et al. und 1972 auch Arimura et al. fest. Beim Schaf fanden unterschiedliche LH- und FSH-Freisetzungscharakteristika nach GnRH-Gaben Reeves et al. 1972, Hopkinson et al. 1974 und beim Rind Schams et al. 1974. Dagegen vertraten Sandow et al. 1975 die Meinung, es gebe nur ein hypothalamisches LH- und FSH-Releasinghormon, der Nachweis getrennter Fraktionen beruhe nur auf Artefaktbildungen während der Isolation. Unterschiedliche LH- und FSH-Freisetzungen sind vielleicht durch ein zusätzliches Regulationsprinzip (Inhibin) bedingt (De Jong und Sharpe 1976 a, b).

1.2.3. Rückkopplungsmechanismen

Das komplizierte Steuerungssystem in biologischen Regelkreisen dient der Aufrechterhaltung einer gewissen Homöostase: in einem System muß ein gewisser "Soll-Wert-Bereich" aufrechterhalten werden, dazu muß der aktuelle "Ist-Wert" stets automatisch korrigiert werden (Hohlweg und Reiffenstühl 1965), was mit Hilfe von Mitkopplungs- und Rückkopplungssystemen (positive und negative Feedback-Mechanismen) erfolgt. Einige Regelkreise der gonadotropen Hormone sind in Abbildung 5 dargestellt.

Die Regelzentren im Hypothalamus empfangen die verschiedenen Informationen, entschlüsseln sie und reagieren darauf qualitativ und quantitativ spezifisch (Karg 1966 a und 1970). Dort werden auch die sogenannten Releasing- und Inhibiting-Hormone freigesetzt (siehe Überblick bei McCann und Porter 1969, Convey 1973, Besser und Mortimer 1974, Palletier 1976) und in die Portalgefäße ausgeschüttet (erstmalig beschrieben bei Popa und Fielding 1930), was dann im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung z.B. des Lutropins und/oder des Follikotropins

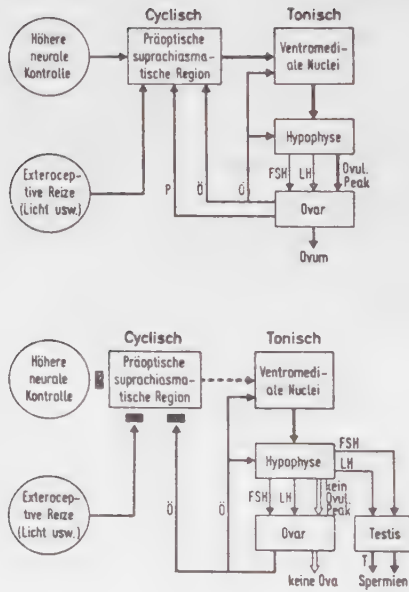


Abbildung 5:

Schematische Darstellung der neuroendokrinen Regulation der Fortpflanzung: Unterschiede zwischen zyklischer und tonischer Sekretion der Gonadotropine (aus Claus 1972 nach Barraclough 1966 und Neumann und Steinbeck 1972)

ins Blut bewirkt, die dadurch Hoden- und Ovarfunktionen beeinflussen können (positiver Feedback). Über den Ausfall der hormonalen Rückwirkung der Keimdrüsenhormone auf den HVL, das Auftreten sogenannter Kastrationszellen nach Wegfall des negativen Feedback nach Kastration berichteten 1931 Hohlweg und Dohrn.

Long-loop-Feedback-Mechanismus:

Im "Long-loop"-Feedback-Mechanismus wirken die nach Gonadotropin-Wirkung gebildeten Gonadensteroiden (Testosteron in den Leydig-Zellen des Hodens, Östrogene nach spezieller FSH-Stimulierung im Hoden und in den Granulosa-zellen im Ovar, Gestagene in den Luteinzellen des Corpus luteum) zurück auf die Adenohypophyse bzw. auf das ZNS. Beim männlichen Individuum wirkt die Überschreitung einer gewissen Testosteronkonzentration im Blut blockierend auf die weitere Freisetzung von LH-/FSH-RH (von zur Mühlen und Köbberlin 1973). Speziell verantwortlich für einen Feedback auf die FSH-Sekretion soll ein spezifisches Tubulushormon ("Inhibin") aus dem Seminalplasma sein (Franchimont und Chari 1974 und Bramble et al. 1975). Nach de Jong und Sharpe 1976 b und Steinberger und Steinberger 1976 wird dieses Inhibin in den Sertolizellen des Hodens gebildet und in die Rete-testis-Flüssigkeit abgegeben, wo es assoziiert an ein Protein mit einem Molekulargewicht von 40 000 - 50 000 Dalton vorliegt (Voglmayr 1976). Die Sertolizellen produzieren gleichzeitig unter FSH-Einfluß das "Androgen bindende Globulin", welches in der Rete-testis-Flüssigkeit eine Transportfunktion für die in den Leydigzellen gebildeten Androgene zum Keimepithel und zum Nebenhoden erfüllt (Hansson et al. 1973 a, b und 1974, Ritzén et al. 1976, Carreau und Drosdowsky 1976). Franchimont et al. 1975 stellten ebenfalls fest, daß die LH-Spiegel durch Testosteron weit stärker unterdrückt werden als die FSH-Werte, daß aber die Reaktion gegenüber LH-RH dabei nicht verändert wird. Geringe Östrogenmengen (30 - 40 µg Tag/Person) unterdrücken nur die FSH-Spiegel (Kulin und Reiter 1973, Legros et al. 1974), während hohe Östrogengaben beim Menschen beide gonadotropen Hormone schnell und nachhaltig unterdrücken (Swerdlhoff und Odell 1968, Burger et al. 1972). Den ersten Nachweis einer Mitkopplung zwischen Gonadensteroiden und Gonadotropinen beim prä-

puberalen Rind geben Odell et al. 1970. Einen LH-Anstieg beim Rind nach Östrogengaben konnten Cummins et al. 1972 feststellen, nachdem bei Schafen Obst et al. 1971 ähnliches finden konnten.

Short-loop und Ultra-short-loop-Feedback:

Neben diesem sogenannten Long-loop-Feedback existiert ein Short-loop-Feedback (postuliert von Sawyer und Kawakami 1959, Djeda und Ramírez 1969 bei der Ratte, von Szontágh 1973 beim Menschen), der die Rückkopplung des HVL auf das Gehirn repräsentiert und in dem die Gonadotropine ihre eigenen Releasing-Hormone im Hypothalamus steuern. Daneben gibt es noch einen sog. Ultra-short-loop-Feedback, der eine Wirkung von Releasing- und Inhibitor-Hormonen auf übergeordnete ZNS-Strukturen beinhaltet.

Genauere Angaben über den Short-loop-Feedback, welcher die von den Sexualsteroiden gesteuerte LH-Freisetzung aus der Hypophyse zusätzlich moduliert, liegen bei der Ratte vor (Kuhl et al. 1974, Kuhl und Taubert 1975 a und b): eine bestimmte endogene LH-Konzentration inhibiert die Ausschüttung von LH-RH und verhindert damit eine weitere Freisetzung von LH aus der Hypophyse. Das L-Cystin-Arylamidase-Enzymsystem, das bei der weiblichen Ratte von einem gewissen Plasma-Östrogenspiegel und bei der männlichen Ratte von einem gewissen Testosteron-Spiegel abhängig ist, wird nach LH-Erhöhung im Blut oder nach exogenen Sexualsteroidgaben (Bickel et al. 1972) aktiviert. Dies führt zu einer erhöhten Inaktivierung von LH-RH in der Eminentia mediana, was wiederum eine geringere Freisetzung endogenen LH's zur Folge hat. Dagegen bestreitet Gay 1974 die Existenz eines solchen Short-loop-Feedback, da erhöhte LH- und FSH-Plasmawerte zu beschleunigter renaler Clearance führen sollen.

Hinweise auf weitergehende Mechanismen, d.h. Neurotransmitter-Wirkungen auf die Gonadotropin-Sekretion finden sich bei Kamperi et al. 1970. Dopamin wirkt als synaptischer Transmitter bei der Freisetzung von FSH-RH in vitro, eine Reaktion konnte durch α -adrenerge-Blocker (Phentolamin) unterdrückt werden, wohingegen β -Blocker keinen Einfluß ausübten. Weitere Hinweise einer cholinergen Kontrolle der Gonadotropin-Sekretion bei der Ratte finden sich bei Libertun und

McCann 1974. Eine inhibitorische Rolle des Serotonins in der Steuerung der Ovulation wird von Ladosky und Noronha 1974 und Wurtman 1976 diskutiert. Einen Überblick über neuere Arbeiten bezüglich beeinflubarer Interaktionsmöglichkeiten zwischen übergeordneten Gehirnregionen, der Hypophyse und dem Ovar gibt Sawyer 1975.

1.3. Episodische und periodische FSH-Sekretion

Der Gehalt der gonadotropen Hormone im Blut ist gewissen Schwankungen unterworfen, die nicht unmittelbar exogenen oder endogenen Beeinflussungen zuzuordnen sind. Für LH konnte beim Menschen festgestellt werden, daß eine "episodische" Sekretion ein normales Zusammenspiel von Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden widerspiegelt (Souvatzoglou et al. 1973); solche "episodischen Spikes" liegen bis zum dreifachen über dem Normalniveau. Rhythmische LH- und FSH-Ausschüttungen konnten beim Menschen Feiman und Winter 1971 finden, die jeweils gegen 8.00 Uhr die höchsten und zwischen 24.00 und 4.00 Uhr die niedrigsten Werte messen konnten. Häufige höchstens 20 - 30 Minuten dauernde Oszillationen ebenfalls beim Menschen fanden Naftolin et al. 1972, sie erklärten episodische Sekretion als eine intermittierende Aktivität der Hypophysenzellen durch nicht gleichbleibende Stimulation hypothalamischer Releasinghormone.

3 - 8 irreguläre FSH-Erhebungen während 24 Stunden stellten Krieger und Fogel 1972 und Piro et al. 1973 fest. Irreguläre Pulsationen, insbesondere von FSH nach GnRH-Infusionen dokumentierten Mortimer et al. 1973 und 1974. Smith et al. 1974 konnten LH-, FSH- und Testosteron-Schwankungen bei verschiedenen Männern nicht untereinander korrelieren. Eine unabhängige Regulation der LH- und FSH-Basalsekretion bei weiblichen Schafen während des Brunstzyklus mit hohen irregulären FSH-Ausschlägen beobachteten Cumming et al. 1973. Foster et al. 1975 a und b stellten ein völliges Fehlen der episodischen FSH-Sekretion bei neugeborenen Schaf-Lämmern bis ca. 9 Wochen Alter fest und folgerten daraus, daß für beide Hormone getrennte negative Short-loop-Feedback-Mechanismen existieren müssen. Keinerlei Rhythmizität einer LH-Episodik beim Schafbock

fand Thibier 1975, wohingegen Lincoln 1976 a, b eine jahreszeitliche Abhängigkeit der LH- und Testosteron-Episodik beim Bock vom Saison-östrus der Schafe beobachtete: die ausgeprägtesten Schwankungen konnten während der stärksten geschlechtlichen Aktivität der männlichen Tiere registriert werden.

1.4. Vorkommen und physiologische Wirkungen von FSH

1.4.1. Pubertät

Als präpuberale Periode wird die Phase zwischen Geburt und Pubertät angesprochen. Die Pubertät umfaßt die Umstellung vom juvenilen zum geschlechtsreifen, aktiv fortpflanzungsfähigen Individuum und ist begleitet von einem beschleunigten Wachstum der Sexualorgane und der allgemeinen körperlichen Entwicklung. Die Sexual- oder Geschlechtsreife umfaßt den gesamten Zeitraum, während dessen die Fortpflanzungsfähigkeit vorhanden ist (Kolb 1967).

Beim Rind treten pubertäre Erscheinungen - zwar stark rassenabhängig - häufig früher beim weiblichen als beim männlichen Tier auf (McDonald 1971). Der Eintritt der Pubertät hängt wahrscheinlich mit Reifungsvorgängen im Hypothalamus und limbischen System oder (und) mit Veränderungen des Hormonrezeptorkomplexes des Erfolgsorgans zusammen.

Desensibilisierungstheorie:

Der hypothalamische "Reifungsprozeß" soll nach Donovan und van der Wert ten Bosch 1965 in einer Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber der Hemmwirkung der Sexualsteroiden beim negativen Feedback bestehen. Der Regelkreis Hypothalamus - HVL - Gonaden ist also auf einen niedrigen Sollwert eingestellt. Zur Zeit der Pubertät sinkt die hypothalamische Empfindlichkeitsschwelle, der Hemmeffekt der Sexualsteroiden reicht in der Folge nicht mehr aus. Beim männlichen Kalb dominiert außerdem vor der Pubertät das schwächer als Testosteron wirksame Androstendion (gemessen in der Vena spermatica von Lindner 1959 und 1961 und Savard et al. 1961), wohingegen im peripheren Plasma Rawlings et al. 1972 und

Giménez 1975 keine Veränderungen messen konnten. Mit der Pubertät wird ein höherer Steroidhormonpegel als Norm empfunden, während vorher kleine bis kleinste Mengen bereits als Maxima registriert wurden (McCann und Ramirez 1964).

Veränderungen in der Rezeptorempfindlichkeit am Erfolgsorgan beim männlichen Tier:

Nicht mit der Desensibilisierungstheorie Übereinzustimmen scheinen die Befunde von Schams und Butz 1972 und Rawlings et al. 1972 für das LH und von Giménez 1975 für das Testosteron bei Bullen; unabhängig von relativ gering schwankenden peripheren LH-Spiegeln bei männlichen Kälbern erfolgt etwa ab der 21. Woche ein biphasischer Testosteronanstieg. Hafs 1974 spricht mehr von qualitativen statt quantitativen Änderungen von präpubertären zu pubertären Bedingungen beim Kalb. Sie laufen wohl insbesondere am Hormonrezeptorkomplex in der Leydigzelle ab, der von Catt et al. 1972 und von Leidenberger und Reichert 1972 beschrieben wurde und der sich schon bei (Ratten-) Embryos nachweisen läßt (Catt et al. 1975).

Diese Veränderungen während der Pubertät können auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Das Enzym Adenylcyclase, das die Hormonwirkung vom membrangebundenen Rezeptorkomplex auf die intrazellulären Erfolgsstrukturen überträgt, ist noch nicht verfügbar oder der spezifische LH-Rezeptor ist noch geblockt. Bei der Ratte ließ sich während der Pubertät nur eine geringgradige Zunahme in der Bindungskapazität des Rezeptors zu LH nachweisen; da zyklisches AMP ebenfalls ausreichend vorhanden war, vermuteten Frowein et al. 1973, daß ein zusätzliches Enzym (-system) erst während der Pubertät vollwirksam wird. Pahnke et al. 1974 konnten während dieser Zeit eine Zunahme der Gesamtzahl der Leydigzellen und gleichzeitig der LH-Bindungskapazität bei parallel einhergehendem Testosteronanstieg nachweisen. Gleichzeitig soll FSH (bei der Ratte) während der Pubertät die Anzahl der LH-Rezeptoren und deren Empfindlichkeit, gemessen an erhöhter Steroidproduktion, steigern (Ketelslegers et al. 1976).

FSH-Bestimmungen um die Pubertät:

1968 bestimmten Desjardins und Hafs mit biologischen Tests FSH-Konzentrationen in Hypophysen weiblicher Rinder von der Geburt bis zum Ende des ersten Lebensjahres; sie fanden relativ hohe Werte um die Geburt, noch ansteigend im ersten Monat und danach langsam abfallend bis zum Beginn des ersten Zyklus mit durchschnittlich 32 Wochen Alter.

Schon präpuberale Rinderhypophysen weisen einen hohen FSH-Gehalt auf, bei weiblichen Kälbern können exogen zugeführte Gonadotropine Ovulationen und Hormonsekretion auslösen (Onuma et al. 1970); beim männlichen Geschlecht konnte dagegen durch Gonadotropine in präpuberalem Stadium keine vollständige vorzeitige Spermienreifung bewirkt werden (Roth 1969, Courot 1970).

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an 4 Bullen zeigten bei 3 Tieren eine Koinzidenz der FSH-Werte mit dem Testosteronanstieg (Giménez et al. 1974 a und b, Karg et al. 1976 a). Bei präpubertären Schafböcken beobachteten Lee et al. 1975 in der 5. und 6. Woche FSH-"Peaks", während der nächsten 30 Wochen fielen die Werte zwar mit starken individuellen Schwankungen etwas ab, um wieder anzusteigen, wenn befruchtungsfähige Spermatozoen im Hoden gefunden werden konnten. Beim weiblichen Schaf waren die FSH-Werte vor und nach der ersten Brunst relativ konstant und zeigten keine so stark pulsatile Ausschüttung wie das LH (Foster et al. 1975).

1.4.2. Brunstzyklus, Follikelwachstum und Ovulation

Das Hausrind ist ein ganzjährig polyöstrisches Tier mit spontaner Ovulation.

Mit biologischen Tests gelang es oft nur während der Proöstrus- und Östrusperiode Gehalte der gonadotropen Hormone LH und FSH in Hypophysen zu bestimmen. Bei der Kuh konnte Smirnova 1945 eine Abnahme des Gonadotropin-Gehalts der Hypophyse um die Brunst beobachten. 1965 stellten Rakha und Robertson fest, daß FSH und LH beim Rind in unterschiedlichem Verhältnis zueinander während des Zyklus sezerniert werden.

Eine signifikante Abnahme sowohl des FSH- als auch des LH-Gehaltes während der ersten 18 Stunden der Brunst konnte von diesen Autoren nachgewiesen werden.

Zusätzliche Daten über die Follitropin-Spiegel beim Rind konnten seit 1974 gewonnen werden. Akbar et al. 1974 beschrieben die Veränderungen der FSH-Werte bei 5 Kalbinnen (bei täglicher Blutentnahmefrequenz): während der Brunst steigen die Konzentrationen auf ca. 1,5-faches Niveau an, um etwa parallel zum präovulatorischen LH-"Peak" ihr Maximum zu erreichen; abgesehen von relativ niedrigen Werten zwischen Ovulation und Tag 4 des Zyklus treten starke Schwankungen auf; höheres Niveau weisen die Spiegel zwischen Tag 7 und 9 und 5 bis 3 Tage vor der erneuten Brunst auf. Geringfügige Schwankungen bei 15 Tieren (ebenfalls einmal tägliche Blutentnahme) konnten Dérivaux et al. 1974 nachweisen, sie stellten aber einen deutlichen zeitlich mit dem präovulatorischen LH-"Peak" zusammenfallenden FSH-Gipfel heraus, der von 104 ng/ml Ausgangsniveau Maximalwerte von 130 - 316 ng/ml erreicht. Geringfügige Erhebungen etwa am 7. - 8. und 12. - 14. Zyklustag sind nicht bei jedem Tier auffallend. Im Gegensatz zu diesen Autoren konnten eigene Arbeiten (Schams und Schallenberg 1974) neben einer zeitlich mit dem präovulatorischen LH-Peak zusammenfallenden Erhebung eine weitere deutlich ausgeprägte Periode erhöhter Werte 4 - 2 Tage vor Brunstbeginn aufzeigen.

Follikelwachstum und Ovulation:

Rakha 1967 beschrieb den Einfluß von Gonadotropinen auf die Ovulation bei Rind und Schaf. Eine Reihe von Übersichtsarbeiten hat sich eingehend mit den neueren Erkenntnissen eines hormonellen Einflusses der Gonadotropine FSH und LH auf Follikelwachstum und Ovulation (Schwartz 1974), auf die Veränderungen des Follikel-epithels bei der Eireifung (Channing und Kammerman 1974) und auf die Oozytenreifung (Schuetz 1974) befaßt. FSH bindet besonders an spezifischen Rezeptoren in Granulosazellen von mittelgroßen bis großen Follikeln (Nimrod et al. 1976), LH bindet hauptsächlich an Thekazellen reifer Follikel und an Corpus luteum Gewebe und nur in geringem Maße an Granulosazellen; FSH moduliert die Menge an FSH-Rezeptoren in den Granulosazellen

(Richards und Midgley 1976). Basalspiegel beider Gonadotropine werden kontinuierlich benötigt, um dauernd ein gewisses Follikelwachstum zu ermöglichen. Follikelatresie kann nach Hormonstimulation (LH oder LH-Wirkung) oder beim Ausbleiben hormoneller Stimulation erfolgen, sie ist stets mit einem Verlust an Rezeptoren für Östradiol, FSH und LH verbunden (Richards und Midgley 1976). FSH ist wahrscheinlich für die frühen Stufen von Follikelwachstum verantwortlich noch bevor eine Östrogensynthese einsetzt. Ein erster Anstieg von FSH über niedrige tonische Spiegel hinaus ist gemeinsam mit LH nötig, um die Follikel in ein gewisses Proliferationsstadium zu bringen, was von Channing 1974 an Rhesusaffen nachgewiesen wurde. Ein zweiter zusätzlicher Anstieg ist für das endgültige Größenwachstum verantwortlich; dieses zweiphasige Geschehen kann über den Zeitraum eines einzigen Zyklus hinausgreifen, deshalb laufen wohl FSH-Wellenbewegungen ab, die von einem bestimmten aktuellen Reproduktionsstand unabhängig sind (Schwartz 1974). FSH löst keine Steroidogenese am Ovar aus, hat aber eine direkte Rolle auf die Induktion des LH-hCG-Rezeptors und der 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität (Zeleznik et al. 1974, Channing 1975). Neal und Baker 1975 unterstützten mit Untersuchungen an isolierten Graaf'schen Follikeln in Zellkulturen die These von Labhsetwar 1972, daß FSH und LH synergistisch Ovulationen auslösen. Hohe Dosen von FSH allein können sogar Ovulation auslösen, wohingegen niedrige Dosierungen bereits 10 mal effektiver als LH Follikelwachstum bewirken. Diesen Beobachtungen an Mäuse-in vitro Präparaten widersprachen Tsafiriri et al. 1976, die an Kulturen von Graaf'schen Follikeln von Ratten mit immunologisch reinem Schaf-FSH nachwiesen, daß FSH sehr wohl Adenylcyclase und nachfolgend Progesteronsynthese in vitro stimulieren konnte, daß aber in vivo prinzipiell eine physiologische Ovulation durch LH ausgelöst wird. Am präpuberalen Rattenovar in vitro konnten Selstam et al. 1976 ebenfalls bereits nach getrennten LH- und FSH-Gaben Freisetzungen von zyklischem AMP messen, wobei LH die FSH-Wirkung nicht veränderte, wohingegen FSH die LH-Wirkung verstärkte.

1.4.3. Trächtigkeit, Geburt und post-partum-Periode

Trächtigkeit:

Eine kontinuierliche Abnahme der gonadotropen Potenz in der Hypophyse beim Rind während der Gravidität ist von Nalbandov und Casida 1940 aufgezeigt worden, Labhsetwar 1964 und Wagner 1968 fanden dagegen aber hohe FSH-Gehalte in Hypophysen um die Geburt. Bei der Frau stellten Faiman et al. 1968 während der Schwangerschaft im peripheren Blut wesentlich höhere radioimmunologisch gemessene Werte als während des Zyklus fest, die auch während der Geburt hochbleiben, dagegen waren die von Parlow et al. 1970 gemessenen FSH-Werte generell niedrig. Relativ konstante Werte in den Hypophysen von trächtigen Schlachtrindern bestimmten Rakha und Igboeli 1972.

Erhebliche Fluktuationen der FSH-Werte während der Trächtigkeit bei der Maus fanden Murr et al. 1975 und bei der Ratte Linkie und Niswender 1972. Bei trächtigen Schafen konnten Chamley et al. 1976 ab dem 135. Tag eine signifikante Abnahme des FSH-Gehalts in den Hypophysen im RIT messen.

Eine Tendenz abnehmender Werte vom 6. zum 9. Trächtigkeitsmonat (allerdings bei nur einer Kuh) stellten Dérivaux et al. 1974 fest. In der 2. Hälfte der Schwangerschaft beim Menschen untersuchte Govan 1970 bei Operationen entnommene Ovarien; er stellte zur Geburt zu vermehrtes Follikelwachstum bis ca. 5 mm Durchmesser fest. Eine rege möglicherweise zyklische Follikelanbildung während der Frühgravidität in den ersten 2 - 3 Trächtigkeitsmonaten bei Kühen mit größten Follikeldurchmessern über 13 mm beobachtete Rüsse 1971, gelegentlich wurden noch im 8. Monat Eibläschen bis 10 mm Durchmesser festgestellt.

Geburt:

Die Kenntnisse über Auslösung und Steuerung des Geburtsvorgangs sind noch lückenhaft; während über das funktionelle Geschehen viel gearbeitet wurde (siehe Übersicht bei Rüsse 1965), stehen bei den Erklärungsversuchen der komplizierten endokrinologischen Abläufe die Steroidhormone im Vordergrund (Kreikenbaum und König 1974, Hoffmann und Karg 1974,

Stabenfeldt 1974). Über den Verlauf des Follikotropins liegen keine gesonderten Untersuchungen vor.

Post-partum-Periode:

Über die post-partum-Phase beim Rind liegen zahlreiche Publikationen vor, die sich mit den morphologischen Veränderungen des Uterus und der Involution der Geschlechtsorgane befassen. Auch über die zeitlichen Abläufe beim Wiederingangkommen des Zyklus sind viele Beobachtungen gesammelt worden (Buch et al. 1955, Wagner 1968 a und b, Rüsse 1968, Wagner et al. 1969 a, b, Morrow et al. 1969, King et al. 1976). Über die tiefgreifenden hormonalen Veränderungen, insbesondere der gonadotropen Hormone beim Rind nach Regression des Gelbkörpers ist die Information noch spärlich, Wagner und Oxenreider 1971 vermuteten noch, daß die Hypophysen-FSH-Gehalte nach der Geburt abnehmen, da ja vermehrtes Follikelwachstum p.p. einsetzt; Fischer 1971 und Echternkamp und Hansel 1974 fanden trotz teilweise frühzeitigen Einsetzens zyklischen Geschehens generell niedrige LH-Werte, abgesehen von einzelnen nur kurzzeitigen Erhebungen, insbesondere präovulatorische LH-"Peaks" waren nur wenig ausgeprägt und diurnale Schwankungen wiesen nur eine geringe Amplitude auf. Relativ niedrige LH-Werte und sehr geringe Schwankungen konnten auch Schams et al. 1972 aufzeigen. Bei Frauen stellten Reyes et al. 1972 und Said und Wide 1973 eine nach normaler Geburt für 10 - 12 Tage dauernde Unterdrückung der FSH-Spiegel fest, meist schon während der folgenden Woche erreichten die Werte wieder Normalniveau.

1.5. Biotechnische und medikamentelle Manipulationen

1.5.1. Releasing-Hormone

Gonadoliberin (GnRH):

Bei vielen landwirtschaftlichen Nutztieren und bei Laboratoriumstieren konnten insbesondere LH-Freisetzungen nach GnRH-Injektionen nachgewiesen werden (siehe Übersichten bei Convey 1973 und Pelletier 1976).

Über Beeinflussung der Ovarfunktionen und radioimmunologische LH-Messungen nach GnRH-Behandlung am weiblichen Rind berichten Schams et al. 1973, Höfer 1973, Hartl 1974, Britt et al. 1974, Kinder et al. 1975, Roche 1975, Mellin et al. 1975 und Dermody et al. 1976. Beziehungen zwischen Androgenspiegeln und freigesetztem Luteinisierungshormon beim Bullen und kastrierten männlichen Rindern beschrieben Mongkonpunya et al. 1974, 1975 und Thibier 1976.

Kaltenbach et al. 1973 und 1974 waren die ersten, die unterschiedlichen LH- und FSH-"Release" bei Kalbinnen feststellten; Zolman und Convey 1973 fanden eine enge Korrelation zwischen LH- und FSH-Spiegeln bei Bullen nach Verabfolgung von GnRH. Eigene Beobachtungen (Schams et al. 1974) weisen erhebliche Unterschiede in dem LH- und FSH-Verlauf bei Rindern nach GnRH-Applikation aus.

Die Möglichkeiten des Einsatzes von Releasing-Hormonen beim Rind sind die Ovarialzystenbehandlung, die Östrussynchronisation und die Ovulationsauslösung gerade beim verzögerten Follikelsprung (Grunert et al. 1974, Hoffmann et al. 1975, Bierschwal et al. 1975, Centley et al. 1975, Bentele und Humke 1976, Seguin et al. 1976).

Synthetische GnRH-Analoga:

Synthetische Polypeptide mit einer geringeren Aminosäureanzahl als das Dekapeptid GnRH erwiesen sich zunächst in vitro und in vivo (an Ratten) als nur äußerst gering oder gar nicht wirksam (Schally et al. 1972); durch Modifikationen in Position 4 und 5 in der Aminosäuresequenz konnten Yanaihara et al. 1972 immerhin Analoga mit einer Freisetzungspotenz von 1 - 4,4 % erhalten. Zumindest ein Teil der biologischen Wirkungen des Moleküls soll auf bestimmten Gruppierungen des C-terminalen Pyruvat-Glutamin-Rings in Position 1 beruhen (Okada et al. 1973). Ein Analog mit höherer Wirkung als das ursprüngliche GnRH, insbesondere was die FSH-Ausschüttung und die Ovulationsauslösung (bei der Ratte) betrifft, synthetisierten Rippel et al. 1973. Ein Nonapeptid mit einer 2,5 fachen Aktivität des GnRH gelang Coy et al. 1974 herzustellen, das insbesondere über eine Wirkungsverlängerung der FSH-Ausschüttung um Faktoren von 3 - 9 (bei Ratten) verfügt (Arimura

et al. 1974). Über die sehr gute Wirkung eines ähnlichen Nonapeptids (Des-Gly-NH₂¹⁰-Proäthylamid⁹)-LH-RH auf die LH-Ausschüttung bei einem Bullen und einer Kuh berichten Mori et al. 1974, die die Wirkung allerdings nicht mit dem ursprünglichen GnRH-Präparat verglichen haben. Analoga mit 5 - 9 x höherer und stark verlängerter, 12 - 24 Stunden dauernder LH und FSH-Freisetzung beim Menschen können durch Einfügen anderer D-Aminosäuren in die Positionen 6 und 7 und durch Ersetzen des Restes in Position 1 durch Alkylamine erhalten werden; diese Verbindungen können subkutan, intravaginal, nasal und oral appliziert werden (Studer 1976).

Luger 1975 wies bei in vitro Versuchen an Rattenhypophysen-Präparaten nach, daß die Aminosäure in Position 8 des GnRH-Moleküls entscheidend für die dreidimensionale Struktur und damit für die Rezeptorwirkungen dieses Moleküls ist; Nonapeptid-Analoga konnten bei diesen Versuchen signifikanten LH- und FSH-Anstieg bewirken, wohingegen Oktapeptid-Analoga keinerlei Wirkung zeigten. Eine zusammenfassende Darstellung pharmakologischer Eigenschaften und physiologischer Wirkungen von GnRH-Analoga gibt Sandow 1976.

Einen deutlichen Depoteffekt eines GnRH-Analogs D-Ser(TBU)⁶-EA¹⁰-LH-RH (Hoe 766) bei Männern auf die FSH-Sekretion fanden Kuhl et al. 1976; dieses Präparat hat nach ihren Angaben 20-fache Wirksamkeit des GnRH mit einer 6 - 8 Stunden anhaltenden Wirkung bei einer Dosierung von 5 µg s.c. Ebenfalls 20-fache Wirkungssteigerung bei Kaninchen und beim Menschen beschrieben Sandow et al. 1976; an weiblichen Schafen konnten Findlay und Cumming 1976 eine 25-fache Potenzsteigerung dieses Präparats Hoe 766 gegenüber GnRH ermitteln.

Thyroliberin (TRH):

TRH bewirkt die Freisetzung von TSH aus der Hypophyse vieler Spezies (siehe Convey 1973) und von Prolaktin, was für das Rind Karg und Schams 1974 und Reinhardt und Schams 1975 aufzeigen konnten. Die Gruppe um Besser berichtete daneben von FSH-Release nach TRH-Gaben beim Menschen (Mortimer et al. 1973). Ein relativ ausgeprägter Effekt

ist bei Männern feststellbar, tritt jedoch kaum bei Frauen auf; die LH-Spiegel sind dabei stets unbeeinflusst (Mortimer et al. 1974 b, McNeilly und Hagen 1974).

1.5.2. Superovulation

Die Superovulation wird durch Gaben von 1600 - 3200 I.E. PMSG ausgelöst. Während der Lutealphase des Zyklus wird häufig 2 Tage später eine Prostaglandin-(Analog-) Injektion appliziert, um eine Luteolyse des Corpus luteum zu provozieren, damit nachfolgende Ovulationen zeitgerecht erfolgen können. Henricks und Landrod 1972 berichteten über Hormonbestimmungen bei der Induktion von multiplen Ovulationen. Henricks et al. 1973, Spilman et al. 1973, Saumande und Felletier 1975 und Moore 1976 untersuchten die Veränderungen in den Hormonspiegeln von LH, Progesteron und Östrogenen nach diesen biotechnischen Manipulationen.

Dérivaux et al. 1976 verglichen die Konzentrationen von LH, FSH, Progesteron und Östradiol nach verschiedenen PMSG-Behandlungsschemata. Parallel zu den Östrogen-Anstiegen ca. 72 Stunden nach PMSG-Injektionen steigen FSH- und LH-Werte an, in 2 Phasen verlaufen Follikelreifung und Ovulation annähernd parallel.

1.5.3. Prostaglandine und Prostaglandin-Analoga

Neben den natürlich vorkommenden Prostaglandinen (A, B, E, F) wurden in den letzten Jahren in zahlreichen Laboratorien neue Analoga synthetisiert; ein besonderes Interesse in fortpflanzungsbiologischen Studien nahm das Analog ICI 80 996 (Estrumate^R) ein. Prostaglandine und Prostaglandin-Analoga haben eine stark ausgeprägte luteolytische Aktivität (Luteolysin), erstmals von Pharis und Wynnarden 1969 an Ratten nachgewiesen.

Einen zusammenfassenden Überblick über experimentelle Befunde bei der Kuh, verglichen mit solchen von Menschen, Affen, Ratten, Meer-

schweinchen und Kaninchen gibt Marsh 1971.

Keine unmittelbaren Auswirkungen von injiziertem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ auf die FSH-Sekretion beim Menschen konnte Craig 1975 feststellen, wohingegen Batta et al. 1974 im Gegensatz zu Warberg et al. 1976 bei Ratten FSH-Erhöhungen fanden. Bei der gleichen Spezies fanden Harms et al. 1974 einen Hauptangriffspunkt von Prostaglandin E_1 und E_2 am ZNS und eine direkte Folgewirkung auf die Hypophyse.

Über Zusammenhänge zwischen Luteolyse mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und dem Analog ICI 80 996 und Brunstinduktion, Zykluslänge, Progesteronabfall und präovulatorischem LH-Peak nach Zyklussynchronisation beim Rind berichten Hartl 1974, van Niekerk et al. 1974, Oxender et al. 1974, Cooper et al. 1974, Dobson et al. 1975, Stellflug et al. 1975, Rajamahendra et al. 1976 und Karg et al. 1976 b.

1.5.4. Prolaktin-Hemmung durch 2-Br- α -Ergokryptin-Methansulfonat

Das Ergotalkaloid 2-Br- α -Ergokryptin, CB 154, wirkt laktations- (Zeilmaker und Carlsen 1962) und prolaktinhemmend (Flückiger und Wagner 1968); die Wirkung scheint auf einer Blockade der Freisetzung des Prolaktins in der Hypophyse zu beruhen (Malven und Hoge 1971, Lu et al. 1971). Stangl 1974 fand bei 5 mit CB 154 behandelten Tieren die erste Brunst post partum nach 9 Tagen, der darauffolgende Zyklus war verkürzt. Zottmeier (unveröffentlichte Daten) konnte zwar auch eine Verkürzung der post-partum-Phase beim Rind feststellen, jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Stangl. Hinsichtlich des Einflusses von CB 154 auf die gonadotropen Hormone liegen noch keine Arbeiten beim Rind vor.

2. METHODIK DER FSH-BESTIMMUNG

2.1. Steelman-Pohley-Biotest

Der wohl heute gebräuchlichste FSH-Biotest, der auch zur Standardisierung aller internationaler Referenzpräparate eingesetzt wird, beruht auf einer Ovargewichtserhöhung juveniler Ratten, deren Ovargewebe unter HCG-Einfluß für FSH konditioniert wurde (Steelman und Pohley 1953, modifiziert von Johnson und Naqvi 1969, 1970); dieser Test kann auch zur Bestimmung der FSH-wirksamen Komponente von PMSG verwendet werden (Johnson und Mallampati 1973). LH- oder HCG-Kontaminationen üben keinen oder nur einen vernachlässigbar geringen Einfluß aus (Christiansen 1972 a, b, Butt 1973).

Durchführung:

Zu testende FSH-Präparationen werden in steigenden Konzentrationsstufen zusammen mit einer Gesamtdosis von 50 I.E. HCG an Gruppen von 6 - 12 weiblichen Sprague Dawley Ratten (18 - 20 Tage alt, 35 - 40 g Körpergewicht) 3 Tage lang mit je 2 täglichen Injektionen von 0,25 ml s.c. verabreicht. Nach Töten der Ratten werden am 4. Versuchstag die Ovarien entnommen, sehr sorgfältig von umgebendem Bindegewebe und von Serosa und Fett befreit und paarweise auf einer Torsionswaage gewogen. Es resultiert eine geradlinige Dosis-Wirkungskurve zwischen Ovargewicht und FSH-Menge. Oft ist jedoch die Aussage etwas eingeschränkt, da nicht alle zu testenden Präparationen unbedingt ausreichende Parallelität ihrer Standardkurven aufweisen.

Bemerkung zu statistischen Angaben:

$\bar{x}$: Mittelwert

s : Standardabweichung

v_k : Variationskoeffizient (in % ausgedrückt)

n : Anzahl von Beobachtungen

Signifikanzberechnungen wurden nach den Angaben und Tabellen zu "Student t-Test" durchgeführt (Einzelheiten zu Statistik- und Signifikanzberechnungen siehe Feigy-Tabellen, 1968).

Eigene Versuche:

In zwei Testreihen wurde die biologische Aktivität von 2 FSH-Hypophysenpräparationen durch Vergleich mit der bekannten Aktivität eines Schaf-Standards bestimmt (siehe auch 2.2.3.):

Schaf-FSH (NIH-FSH-S₆)¹ wurde in Konzentrationsstufen von 70, 105 und 140 µg Gesamtdosis/Tier ausgetestet; zwei bovine FSH-Standardpräparate (Ambinon-FSH² und NIH-FSH-B₁)¹ wurden in Gesamtdosierungen von 500, 600, 800 und 1000 µg bzw. 200 und 400 µg/Tier injiziert. Die durchschnittlichen Ovargewichte der einzelnen Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der injizierten FSH-Menge sind in Abbildung 6 dargestellt. Es ergibt sich eine gute Parallelität der linearen Ovargewichtszunahme (Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden: NIH-FSH-S₆ R = 0,998, AMBINON-FSH R = 0,985) der 3 zu testenden Präparationen, so daß sich die einzelnen Potenzen untereinander vergleichen lassen.

Folgende biologische Aktivitäten lassen sich dabei im Vergleich zu dem internationalen Referenzpräparat NIH-FSH-S₁ ermitteln (als Berechnungsgrundlage dient die Aktivitätsangabe für NIH-FSH-S₆, bezogen auf das internationale Referenzpräparat NIH-FSH-S₁):

$$\begin{aligned}\text{NIH-FSH-S}_6 &= 1,24 \times \text{NIH-FSH-S}_1 \text{ (Berechnungsgrundlage, Angaben des NIH)} \\ \text{NIH-FSH-B}_1 &= 5,23 \times \text{Ambinon-FSH} = 0,68 \times \text{NIH-FSH-S}_6 = \\ &= 0,84 \times \text{NIH-FSH-S}_1 \\ \text{Ambinon-FSH} &= 0,19 \times \text{NIH-FSH-B}_1 = 0,13 \times \text{NIH-FSH-S}_6 = \\ &= 0,16 \times \text{NIH-FSH-S}_1\end{aligned}$$

1) Diese Standardpräparation wurde von den National Institutes of Health, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

2) Diese Präparation wurde von Organon, Oss, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

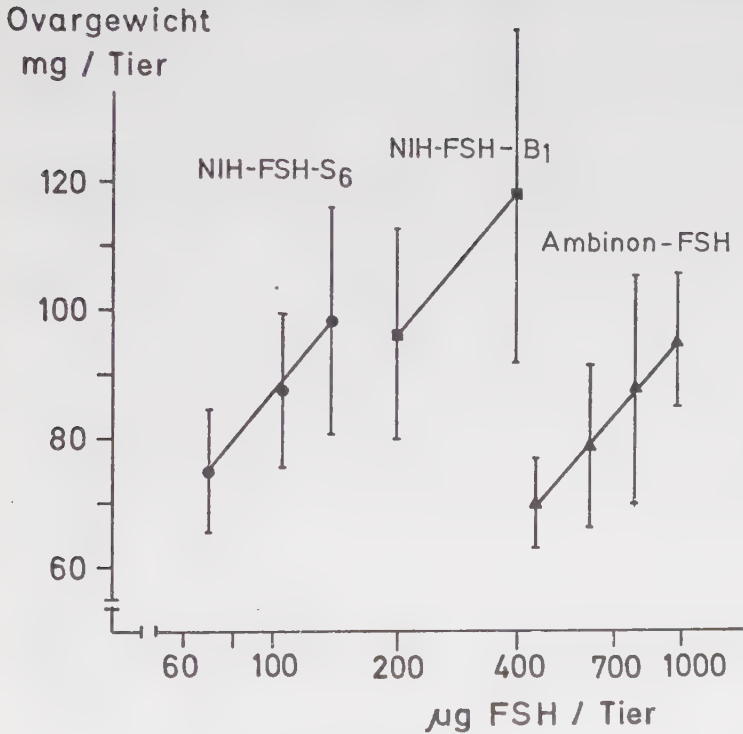


Abbildung 6:

Beispiel eines Steelman-Pohley-Biotests zur Ermittlung der biologischen Potenz von 3 FSH-Standardpräparationen

●—● NIH-FSH-S₆ ■—■ NIH-FSH-B₁ ▲—▲ Ambion-FSH

(Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils 6 - 8 Parallelbestimmungen)

2.2. Radioimmunotest

2.2.1. Prinzip

Die theoretischen Grundlagen, Prinzipien und Methoden diverser Radioimmunotests sind in folgenden Übersichten ausführlich zusammengestellt: Odell und Daughaday 1971, Kirkham und Hunter 1971, Berson und Yalow 1973, Sönksen 1974, International Atomic Energy Agency (IAEA) 1970, 1974, 1976 und Karg et al. 1976 c.

Grundlage eines jeden Radioimmunotests ist die Hemmung in der Bindung von markiertem Protein (Hormon) an den spezifischen Antikörper durch unmarkiertes Protein (Hormon), ausdrückbar in folgenden Gleichungen (nach Berson und Yalow 1968):



freies markiertes Antigen		spezifischer	$\rightleftharpoons$	markierter Antigen- Antikörper-Komplex
freies unmarkiertes Antigen	+	Antikörper	$\rightleftharpoons$	unmarkierter Antigen- Antikörper-Komplex

Daraus lassen sich Dosiswirkungskurven (Standardkurven, Eichkurven) als Funktion einer bestimmten Menge markierten (= in einem Zählgerät meßbaren) Antigen-Antikörper-Komplexes in Abhängigkeit von einer bekannten Menge unmarkierten Standard-Hormons aufstellen. Diese Funktion kann auf drei verschiedene Arten dargestellt werden:

$$\begin{aligned}
 \text{absolute Bindung} &= \frac{\text{Menge des markierten AG/AK-Komplexes}}{\text{Gesamtmenge markierten Antigens}} \\
 \text{relative Bindung} &= \frac{\text{Menge des markierten AG/AK-Komplexes}}{\text{Menge des max. gebundenen AG/AK-Komplexes}} \\
 \text{Zählrate} &= \frac{\text{Impulse des markierten AG/AK-Komplexes}}{\text{Zählzeit}}
 \end{aligned}$$

Die Konzentration des freien markierten Antigens und des spezifischen Antikörpers sind im RIT bekannt, bei der Standardkurve dazu noch die Konzentration des unmarkierten Antigens; daraus werden durch Vergleich mit der Standardkurve die Hormonkonzentrationen unbekannter Proben aus der Zählrate/Zeiteinheit oder aus dem jeweiligen Bindungsprozentsatz bestimmt. Eine Grundbedingung für jedes Testsystem ist die immunologisch identische Reaktion von Standard und zu messendem Hormon in ihrer Fähigkeit zu kompetitiver Hemmung am Antikörper; dies bedingt nicht die identische Immunreaktivität von markiertem, Standard- und zu messendem Hormon (Berson und Yalow 1973).

Homologer, heterologer bzw. kreuzreagierender RIT:

Bei einem homologen RIT-System sind alle verwendeten Antigene und Antikörper streng speziesspezifisch. Beispiele homologer FSH-RIT's gibt es beim Menschen (Midgley 1967, Faiman und Ryan 1967) und beim Geflügel (Godden et al. 1975).

In einem heterologen System wird die Reaktion eines Antiserums mit dem markierten Antigen einer unterschiedlichen Spezies ausgenützt, da Proteohormone verschiedener Spezies den gleichen Typus biologischer, aber unterschiedlicher immunologischer Aktivität besitzen können (Midgley 1971); zahlreiche Kreuzreaktionen und unspezifische Bindungen von FSH-Antikörpern vieler Spezies bedingten heterologe Systeme: Schaf: Salomonsen et al. 1973 a, b; Rind: Akbar et al. 1974. Im kreuzreagierenden System sind markiertes Hormon und Antiserum speziesspezifisch, das Standardhormon muß eine hohe immunologische Kreuzreaktion aufweisen (Schams und Schallenberger 1976).

2.2.2. Puffer und Chemikalien

Phosphat-Puffer 0,5 M, pH 7,5:

Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	37,24 g
(Merck 6580)	
prim. Kaliumphosphat KH_2PO_4 (Merck 4873)	5,58 g
H_2O	ad 500,00 ml

durch Verdünnung mit Wasser kann daraus 0,05 M und 0,01 M
Phosphatpuffer pH 7,5 hergestellt werden.

Albumin-Puffer pH 7,5:

human Albumin (Behringwerke, Marburg)	500,0 mg
Titriplex III $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,8 g
(Merck 8418)	
0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5	ad 1000,0 ml

Veronal-Puffer 0,07 M, pH 8,6 (für Markierung):

5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$	14,43 g
(Merck 6318)	
H_2O	ad 1000,0 ml

Veronal-Puffer 0,1 M, pH 8,6 (für Papierelektrophorese):

5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz	20,60 g
H_2O	ad 1000,0 ml

Essigsäure-Acetat-Puffer 0,1 M, pH 5,0:

Natriumacetatlösung (1,361 g Natriumacetat/100 ml H ₂ O) (Merck 6267)	90,0 ml
---	---------

Essigsäurelösung (0,577 ml Eisessig 96,5 %/100 ml H ₂ O) (Merck 55)	45,0 ml
---	---------

Sephadex-G-50 (Pharmacia, Frankfurt), gelöst in 0,07 M Veronalpuffer
Zellulose (aus Buchenholz) Typ HBS (Serva, Heidelberg Nr. 45421), gelöst
in 0,01 M Phosphat Puffer

Perhydrol 30 % (Merck 7209)

Lactoperoxidase (aus Kuhmilch) (Boehringer, Mannheim Nr. 15491), gelöst
in Essigsäure-Acetat-Puffer

2.2.3. FSH-Präparationen

Als Standardpräparationen fanden 2 relativ gering gereinigte Rinder-FSH-Hypophysenpräparationen Verwendung:

Ambinon-FSH:

Das lyophilisierte Pulver wird bei 0°C im Kühlraum aufbewahrt und wies noch nach 5 Jahren Lagerung keinen Aktivitätsverlust auf; zur Verwendung im Test wird es in 0,5 M Phosphatpuffer gelöst und in einer Konzentration von $20\text{ }\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ in 0,2 ml Portionen bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Die biologische Potenz dieses Präparats wurde als durchschnittlich $0,16 \times \text{NIH-FSH-S}_1$ ermittelt (siehe Kapitel 2.1.).

Folgende Verdünnungen mußten aufgrund der geringen Aktivität als abgestufte Konzentrationen zur Erstellung einer Standardkurve gewählt werden: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 ng/0,3 ml Ansatz. Die untere Empfindlichkeitsgrenze der Dosis/Wirkungskurve lag bei ca. 40 ng/0,3 ml oder 133 ng/ml, die obere Grenze für eine Auswertung lag bei etwa 600 ng/0,3 ml oder 2000 ng/ml.

Dieser "hauseigene" Standard wurde 1974 von einem international vom NIH eingeführten Standard mit etwas höherer Aktivität abgelöst.

NIH-FSH-B₁:

Nach Angaben der National Institutes of Health kann die lyophilisierte Substanz gekühlt ohne Wirkverlust gelagert werden; die in 0,5 M Phosphatpuffer gelösten Stammkonzentrationen für den RIT von $20\text{ }\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ in 0,2 ml Portionen sind maximal 2 Monate im Gefrierschrank bei -20°C ohne Aktivitätsverlust lagerfähig, danach tritt ein rascher Abfall an Aktivität auf, so daß nach 3 Monaten die Aktivität ungefähr der des Ambinon-Standards entspricht.

Frisch gelöstes NIH-FSH-B₁ erwies sich im RIT als durchschnittlich $3,5 \times$ aktiver als Ambinon-FSH, die biologische Potenz errechnet sich als $3,06 \times$ aktiver, wenn die von NIH ermittelte biologische Aktivität von $0,49 \times \text{NIH-FSH-S}_1$ als Berechnungsgrundlage dient.

Folgende Verdünnungsstufen wurden für die Standardkurve gewählt:

1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 600 ng/0,3 ml Ansatz.
Die untere Nachweisgrenze im Routinetest lag bei 10 ng/0,3 ml oder 33 ng/ml, die obere Nachweisgrenze bei 300 ng/0,3 ml oder 1000 ng/ml.

Angaben von FSH-Konzentrationen im Blutplasma oder -serum sind auf zwei verschiedene bovine Standardpräparationen bezogen:

- a) In jeweils gekennzeichneten Einzelbeispielen auf Ambinon-FSH-Standard mit einer biologischen Aktivität von $0,16 \times \text{NIH-FSH-S}_1$, dem internationalen Referenzpräparat, oder $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$.
- b) In allen nicht speziell hervorgehobenen Darstellungen auf NIH-FSH-B₁-Standard mit einer biologischen Aktivität von $0,49 \times \text{NIH-FSH-S}_1$; diese Präparation weist also eine 3,06 fach höhere biologische Aktivität als Ambinon-FSH auf.

Schaf-FSH I/II zur radioaktiven Markierung:

Da keine bovinen Präparationen mit hoher biologischer Aktivität verfügbar sind, wurde für die radioaktive Markierung die hochgereinigte Schaf-FSH-Hypophysenpräparation FSH I/II verwendet, die Dr. Schams aus einem Hypophysenrohextrakt (der 1971 von der Fa. Schering, Berlin, zur Verfügung gestellt worden war) durch verschiedene Chromatographie-Schritte gewinnen konnte (Einzelheiten siehe Schams und Schallenger 1976). Dieses FSH I/II weist eine biologische Aktivität von $31 \times \text{NIH-FSH-S}_1$ auf gegenüber $3 \times \text{NIH-FSH-S}_1$ des Rohextrakts. Das lyophilisierte Hormon wird bei 0°C im Kühlraum gelagert und ist gelöst in 0,5 M Phosphatpuffer in einer Konzentration von 20 µg/0,1 ml bei -18°C 2 Jahre ohne Aktivitätsverlust stabil.

2.2.4. Antisera gegen FSH

Im Routine Test wird gegenwärtig ein Anti-Schaf-FSH-Serum vom Meerschweinchen Nr. 1, Serumpool der Entnahmen vom 11. und 26. 2. 1971,

verwendet. Dieses Antiserum wurde zweimal 1 : 4 und 1 : 9 an Blutserum, welches 72 Stunden nach einer Hypophysektomie von einem Schaf gewonnen wurde¹⁾, absorbiert und in einer Stammverdünnung von 1 : 100 in Albuminpuffer gelöst, bei -18°C im Gefrierschrank gelagert.

Die mögliche Endverdünnung des Antiserums im RIT wird stark vom verwendeten 2. Antikörper beeinflusst; sie schwankte von 1 : 30 000 bis 1 : 80 000.

Antikörpergewinnung:

Weibliche Meerschweinchen (300 - 400 g Körpergewicht, 3 - 4 Monate alt) erhielten in 3 wöchigem Abstand Injektionen von 400, 200, 200 und 100 μg FSH I/II in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und suspendiert in 0,5 ml Freund's Adjuvant complete (i.m., s.c. und i.p. Injektionen). 3 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere in Äthernästhesie durch Herzpunktion entblutet.

Spezifität der Antisera:

Von 10 ausgetesteten Antisera wiesen nur drei ausreichenden Titer und geforderte Spezifität auf, um im Radioimmunotest eingesetzt werden zu können. Alle anderen hatten zu starke Kreuzreaktionen mit LH, TSH, Wachstumshormon und Prolaktin.

Absättigung geringer Kreuzreaktionen:

Alle drei spezifischen Antisera wiesen ab einer bestimmten Konzentration kreuzreagierender Hormone einen Plateaueffekt auf (Tabelle 3); deshalb konnte durch Zugaben geringer Mengen kreuzreagierender Hormons zur Antiserumendverdünnung diese Quelle möglicher Hormoninterferenzen ausgeschaltet werden (siehe auch Abbildung 7).

Präabsorption von Antisera an Serum von hypophysektomierten Tieren:

Eventuell mögliche Interferenzen von im Blutplasma oder -serum enthaltenen Bestandteilen, die im RIT eine nicht identische Reaktion von Standardhormon und endogenem FSH bewirken können, wurden durch 2 - 3 malige

¹⁾ Dieses Blutserum wurde freundlicherweise von Dr. R. Denamur, Frankreich, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3:

Kreuzreaktionen verschiedener Anti-Schaf-FSH-Seren vom Meerschweinchen

	M 1	M 60	M 62
Antikörperend-			
verdünnung im RIT	1 : 80 000	1 : 5000	1 : 30 000
Plateau-effekt bei			
Kreuzreaktion:			
200 ng NIH-TSH-B ₅	6 %	7,5 %	5 %
200 ng b-LH-Papkoff	5,5 %	10 %	4 %
200 ng NIH-GH-B ₁₅	-	-	1 %
200 ng NIH-P-B ₂	-	-	-
Hormonaddition je 0,1 ml Antiserum			
Kreuzreaktion nach	+ 10 ng TSH	+ 20 ng TSH	+ 15 ng TSH
Hormonaddition:	+ 1 ng LH	+ 5 ng LH	+ 2,5 ng LH
200 ng NIH-TSH-B ₂	2 %	2 %	1,5 %
200 ng b LH-Papkoff	1 %	3 %	0,5 %
200 ng NIH-GH-B ₁₅	-	-	1 %
200 ng NIH-P-B ₂	-	-	-

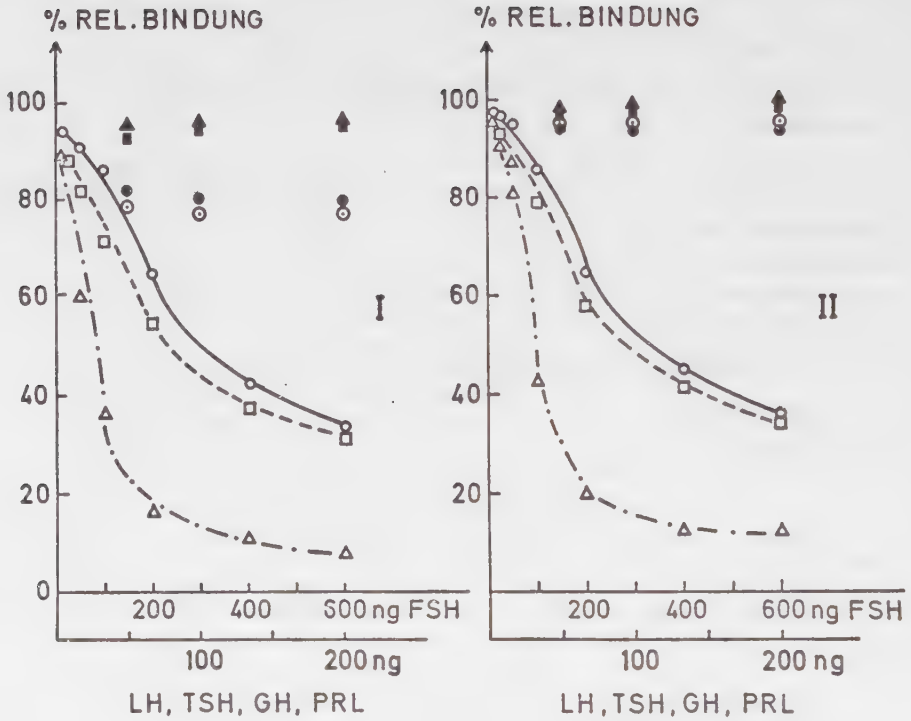


Abbildung 7:

Kreuzreaktionen eines FSH-Antiserums mit hypophysären Protein-Hormonen im Radiomunotest ohne (I) und nach Präabsorption des Antiserums mit TSH und LH (II); Antiserumendverdünnung 1 : 80000

- | | | | |
|-------|------------------------|-----|------------------------|
| ○ — ○ | NIH-FSH-B ₁ | ⊙ ⊙ | NIH-TSH-B ₅ |
| △ — △ | NIH-FSH-B ₆ | ● ● | NIH-LH-B ₈ |
| □ — □ | NIH-FSH-P ₁ | ■ ■ | NIH-GH-B ₁₅ |
| | | ▲ ▲ | NIH-P-B ₂ |

Präabsorption der Antisera an Blutserum von einem hypophysectomierten Schaf im Verhältnis 1 : 4 oder 1 : 9 weitgehend ausgeschaltet.

2.2.5. Präzipitierender (2.) Antikörper

Da aufgrund zu geringer Konzentrationen der erste Antigen-Antikörper-Komplex in Lösung verbleibt, fand als Trennverfahren eine Doppel-Antikörper-Methode Verwendung. In einem Schaf wird ein sogenannter "zweiter" Antikörper produziert, der gegen das Antiserum vom Meerschweinchen gerichtet ist; dieses Anti-Gamma-Meerschweinchen-Globulin vom Schaf präzipitiert den ersten Antigen-Antikörper-Komplex, was durch Zugabe von normalem Meerschweinchen Serum noch verstärkt wird. Die optimale Verdünnung des zweiten Antikörpers muß für jede einzelne Charge durch Ermittlung der Bindungsfähigkeit ausgetestet werden (Beispiele siehe Tabelle 4); in dem angegebenen Beispiel wurde eine Endverdünnung von 1 : 234 gewählt, da dabei genau die mittlere absolute Bindung des Radioimmunitests erreicht werden konnte.

2.2.6. Radioaktive Markierung von FSH

Für die radioaktive Markierung wurde grundsätzlich im Routinetest Schaf FSH I/II verwendet (siehe 2.2.3.).

2.2.6.1. Chloramin-T-Methode

Sie wurde erstmals von Greenwood et al. 1963 beschrieben und von Hunter 1970 allgemein standardisiert. Chloramin-T als relativ starkes Oxidationsmittel oxidiert J^- zu J^+ ; da bei der radioaktiven Markierung stets ein Überschuß von J^+ vorliegt, da nicht in jedes vorliegende Tyrosin-Molekül Jod eingebaut wird, fügt man nach kurzer Reaktionszeit Natriummetabisulfit ($Na_2S_2O_5$) im Überschuß zu, um jedes noch frei vorliegende Jodion wieder zu J^- zu reduzieren; für eine Stabilisierung

Tabelle 4:

Beispiel einer Austestung der Präzipitationsfähigkeit einer 2. Antikörpercharge: Anti-Meerschweinchen-Gamma-Globulin vom Schaf "Moritz", Mischung vom 15.3.76; konstante Konzentration des zu präzipitierenden normalen Meerschweinchenserums (1 : 1800), konstante Antiserumendverdünnung von 1 : 80 000 (Anti-Schaf-FSH, Meerschweinchen 1, Plasmapool vom 11. und 26. 2. 1971, abgesättigt mit 10 ng TSH und 1 ng LH/0,1 ml Antiserum).

Endverdünnung 2. Antikörper	absolute Testbindung (%)	
	Blindwert	600 ng/0,3 ml
1 : 72	50,8	14,2
1 : 84	50,7	11,1
1 : 114	50,7	10,2
1 : 144	50,3	10,2
1 : 174	50,3	10,1
1 : 204	50,2	10,1
1 : 222	49,8	10,0
1 : 234	45,0	9,8
1 : 264	44,2	9,4
1 : 294	42,0	8,8

dieser Reaktion und zur Verminderung einer unvermeidlichen Adsorption radioaktiv markierten Proteins an Glas wird zusätzlich noch Kaliumjodid (KJ) zugegeben.

Markierungsvorschrift:

1 mCi ^{125}J in 50 μl 0,5 M Phosphatpuffer
5 μg Schaf FSH I/II in 25 μl 0,5 M Phosphatpuffer
10 μg Chloramin-T frisch gelöst in 25 μl 0,05M Phosphatpuffer
Oxidationszeit 2 Sekunden (!)
50 μg Natriummetabisulfit in 0,3 ml 0,05 M Phosphatpuffer
5 mg Kaliumjodid in 0,4 ml 0,05 M Phosphatpuffer

Die Oxidationszeit mußte für das empfindliche Hormon FSH auf 2 Sekunden beschränkt werden; die Durchführung der Markierung war deshalb sehr schwierig, da bei geringer Verlängerung der Reaktionszeit zwar ein Anstieg des markierten Hormonanteils erreicht werden konnte, gleichzeitig aber "Damage" und Hormonadsorption an Glas überproportional anstiegen.

Mit der Chloramin-T-Methode konnten für FSH nur sehr unbefriedigende Resultate erzielt werden, da der Gesamtanteil proteingebundenen radioaktiven Jods selten höher als 10 % lag. Dies war für größere Tests oft kaum ausreichend, zusätzlich schwankten die erzielten Testbindungen zwischen 10 und 70 % absoluter Bindung, was reproduzierbare Messungen kaum ermöglichte. Das markierte FSH war nur maximal 2 - 3 Tage stabil und zeigte darüber hinaus stark ansteigenden "Damage"-Anteil mit Abfall der Bindungskapazität.

2.2.6.2. Enzymatische Methoden

Die Oxidationsvorgänge bei der Markierung können auch durch Peroxidasen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxid bewirkt werden (Marchalonis 1969, Morrison und Bayse 1970, Thorell und Johansson 1971, Frantz und Turkington 1972).

Enzymatische Markierungen werden zunehmend bei sehr "empfindlichen" Hormonen zur Markierung eingesetzt: human-FSH (Ketelslegers und Catt 1974), Schaf-LH und -FSH (Rajaniemi et al. 1970), Schweine-ACTH (McIlhinney und Johansson 1971), human Glucagon, Gastrin und Insulin (Holohan et al. 1973).

Markierungsvorschrift (modifiziert nach Holohan et al. 1973):

0,5 mCi ^{125}I in 50 μl 0,5 M Phosphatpuffer
5 μg Schaf-FSH I/II in 25 μl 0,5 M Phosphatpuffer
150 ng H_2O_2 -Lösung, 0,88 mM in 10 μl (2 x in 7,5 Minuten Abstand)
1,25 μg Lactoperoxidase in 25 μl 0,05 M Essigsäure-Acetat-Puffer

Die Markierung wird bei Zimmertemperatur hinter einer 5 cm dicken Bleiabschirmung in einem 2 ml fassenden spitz zulaufenden silikonbeschichteten Bleiglaszylinder durchgeführt:

Die Oxidation läuft an, wenn zu den 85 μl Lösung aus Natriumjodid, FSH I/II und

H_2O_2 die 25 μl Lactoperoxidase zugefügt werden;

nach 7,5 Minuten Reaktionszeit werden nochmals 10 μl H_2O_2 zugegeben, was das Markierungsergebnis nachhaltig verbessert, ohne gleichzeitig den "Damage" zu erhöhen. Nach 15 Minuten Gesamtreaktionszeit ist das Ende jeglicher Oxidationsvorgänge erreicht, bei weiterer Verlängerung der Reaktionszeit läßt sich keine Steigerung des Ergebnisses mehr erreichen; da das Enzym eine sehr kurze effektive Halbwertszeit hat, ist es somit nicht nötig, die Reaktion abzustoppen oder das kleine Volumen von 120 μl weiterzuverdünnen (Hunter 1974). Das Reaktionsgemisch wird einfach zur nachfolgenden Gelfiltration auf eine Sephadex-G-50 Säule überführt.

2.2.7. Reinigung und Charakteristik des radioaktiv markierten FSH

Nach der radioaktiven Markierung von Hormonen muß der Anteil des markierten Proteins von nicht eingebautem freien Radiojodid getrennt werden.

2.2.7.1. Gelfiltration (1. Reinigung, Entsalzen)

Das markierte FSH wird auf eine ca. 30 ml fassende und 20 cm hohe Sephadex-G-50 Säule aufgetragen, welche mit 0,05 M Phosphatpuffer äquilibriert und mit 20 mg Human-Serum-Albumin beschickt worden war. Das Hormon wird mit 0,07 M Veronal-Puffer eluiert. Sephadex ist ein Polydextranderivat mit einer Netzstruktur, die durch Brückenbindungen zwischen den einzelnen Dextranketten entsteht; die Netzweite bestimmt die "Porengröße" und damit die Verwendbarkeit; G-50 trennt Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 35 000.

Nach ca. 6 ml Eluat erscheint der sog. organische "Peak", der das markierte FSH umfaßt, ab ca. 12 ml erscheint der sog. Salz-"Peak" mit dem freien Radiojodid (siehe Abbildung 8). Im ersten ml des eluierten organischen "Peaks" erscheinen auch geschädigte Proteinanteile und/oder markiertes Enzym, da diese Fraktion im RIT kaum eine Bindung aufweist und bei der Papierelektrophorese langsamer wandert als die folgenden Fraktionen. Die besten Markierungen ergeben etwa einen organischen "Peak" von 20 - 30 % radioaktiver Inkorporation.

2.2.7.2. Papierelektrophorese des eluierten organischen "Peaks"

Zur Qualitätskontrolle, ob eventuell bei einer enzymatischen Markierung Lactoperoxidase mit markiert wurde, was die Bindungskapazität in einem anschließenden Radioimmuntest stark vermindern würde, kann eine Papierelektrophorese durchgeführt werden.

Die Elektrophorese wird in einer Elektrophoresekammer der Fa. Shandon auf 21 x 4 cm Chromatographiepapier-Streifen, Nr. 2316 der Fa. Schleicher &

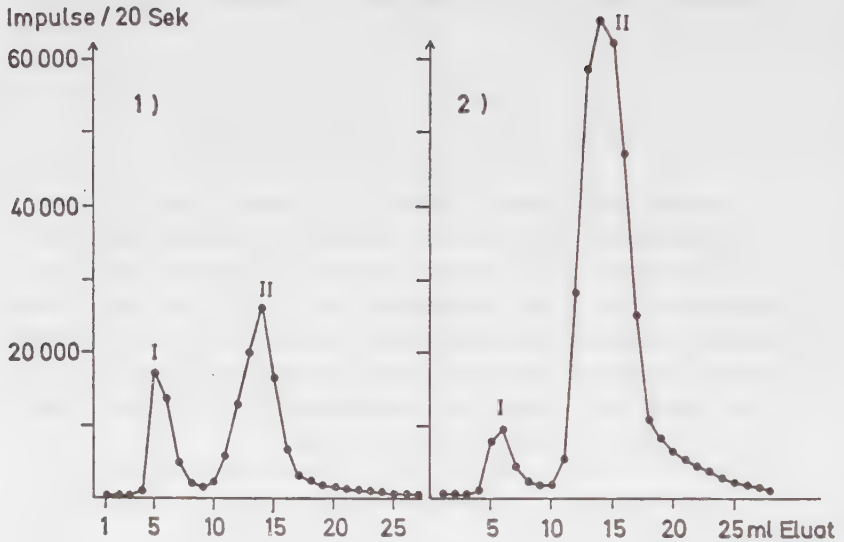


Abbildung 8:

Vergleich Gelfiltration von markiertem FSH I/II mit Sephadex-G-50 nach enzymatischer (1) und Chloramin-T-Markierung (2).

I: Protein-"Peak" (markiertes Hormon)

II: Anorganischer "Peak" (freies ^{125}J)

1: enzymatische Markierung ($0,5 \text{ mCi } ^{125}\text{J}$, $5 \mu\text{g FSH I/II}$)

2: Chloramin-T-Markierung ($1 \text{ mCi } ^{125}\text{J}$, $5 \mu\text{g FSH I/II}$)

Schüll, durchgeführt. 0,1 ml des zu trennenden radioaktiven Materials wird 5 cm vom unteren Streifenende linear aufgetragen und läuft bei 300 V 90 Minuten vom Minus- zum Pluspol; als Elektrodenpuffer dient Veronalpuffer, 0,1 M, pH 8,6. Nach beendeter Elektrophorese werden die Streifen getrocknet, in 1-cm-Abschnitte geschnitten und die Radioaktivität einzeln im Gamma-Zähler ermittelt.

Wie aus Abbildung 9 zu ersehen, bei der je eine "schlechte" und "gute" Markierung von FSH I/II einer Markierung von Lactoperoxidase gegenübergestellt sind, unterscheiden sich Hormon und Enzym in ihrer Wanderungscharakteristik: während der Großteil eventuell markierten Enzyms am Auftragspunkt verharret, wandert markiertes Hormon 5 - 6 cm weiter in Richtung Pluspol.

2.2.7.3. Zweite Reinigung über Zellulose-Säule

Um intaktes radioaktiv markiertes FSH von "Damage-Produkten" (entstanden durch Radiolysis, Aggregatbildung, Desaminierung von Proteinen) zu trennen, wird unmittelbar vor Verwendung des markierten Hormons im RIT noch eine 2. Reinigung über eine 15 ml Zellulose-Säule durchgeführt. "Damage" kann nicht von der Säule gebunden werden, er wird deshalb mit ca. 20 ml 0,01 M Phosphatpuffer ausgewaschen. Gebundenes immunreaktives FSH kann nach Beschicken der Säule mit Serumalbumin (Pferde-Serum 1 : 4 mit 0,5 M Phosphatpuffer verdünnt) eluiert werden.

Zwei typische Elutionskurven einer 2. Reinigung nach enzymatischer Markierung und nach Chloramin-T-Markierung sind in Abbildung 10 dargestellt.

2.2.7.4. Lagerungsprobleme

Enzymatisch radiojodiniertes FSH kann in Anschluß an die 1. Reinigung bei -20°C im Gefrierschrank etwa 10 Tage lang gelagert werden; danach übersteigt bei einer anschließenden 2. Reinigung der "Damage"-Anteil 50 %, wobei gleichzeitig die Testbindung durchschnittlich unter 40 % fällt. Einen Überblick über diese Zusammenhänge gibt Tabelle 5.

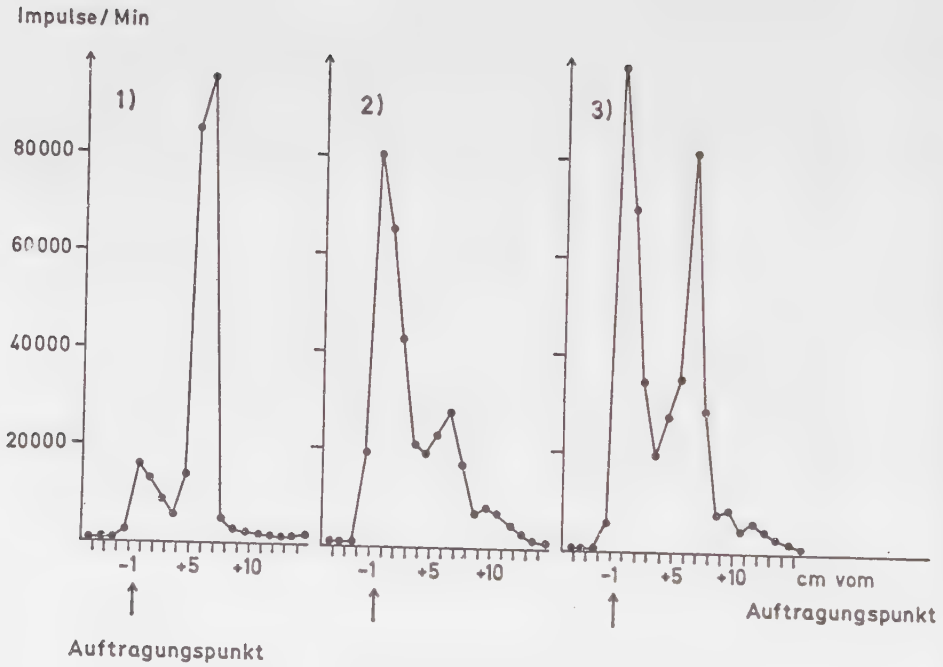


Abbildung 9:

Papierelektrophorese nach radioaktiver Markierung:

1: markiertes FSH I/II

2: markierte Lactoperoxidase

3: Gemisch aus gleichzeitig markiertem FSH I/II und markierter LPD

Tabelle 5:

Einfluß der Lagerungszeit auf den "Damage"-Anteil nach 2. Reinigung und auf die absolute Testbindung von bei -20°C eingefrorenem enzymmarkiertem FSH I/II

2. Reinigung	"Damage"	absolute Testbindung
Tage nach Markierung	%	%
0	11	59,2
1	20	58,4
4	39	50,0
6	41	49,0
11	53	41,7
14	69	33,4

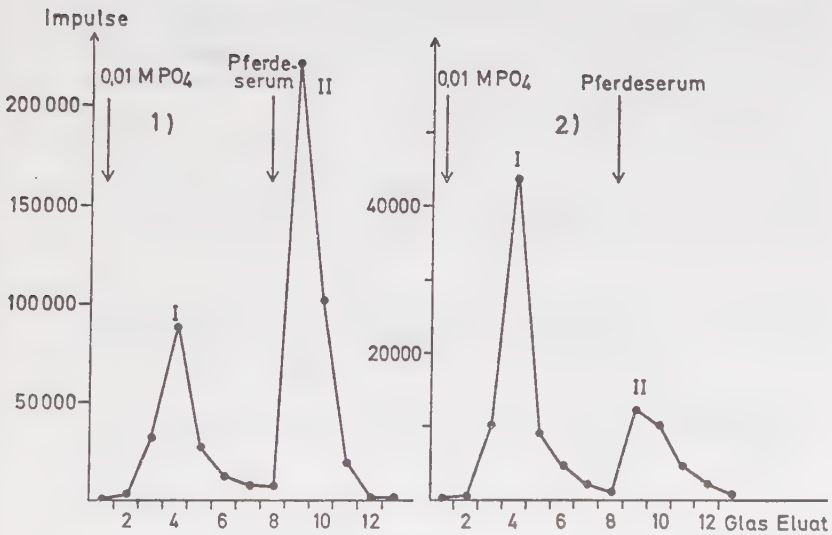


Abbildung 10:

Zellulosereinigung von markiertem FSH I/II: Vergleich von enzymatischer (1) und Chloramin-T-Markierung (2)

I: "Damage-Peak", ausgewaschen mit 0,01 M Phosphatpuffer

II: Immunreaktiver "Peak", eluiert mit Pferdeserum, verdünnt

1 : 4 in 0,5 M Phosphatpuffer

2.2.7.5. Kennwerte nach Markierung (Berechnungsbeispiele)

Spezifische Aktivität (Markierung vom 23. 1. 1976):

Gesamtaktivität von ^{125}J (20 cm Zählabstand)	238 078 Impulse
verwertbarer Protein-Peak nach 1. Reinigung (Glas 5 - 8)	39 379 "
Restaktivität Ampulle*	22 375 "
Restaktivität Pipette*	2 640 "
markierte Gesamtmenge	64 392 "

Berechnung der markierten Hormonmenge, welche für den anschließenden RIT verwendet wurde (Glas 5):

markierte Gesamthormonmenge	5 μg FSH I/II	64 392 "
markiertes Hormon in Glas 5	x	17 304 "

$$x = \frac{17\,304 \times 5}{64\,392} = 1,35 \mu\text{g FSH I/II}$$

Berechnung der Aktivität einer ^{125}J -Charge zur Eiweißmarkierung:

Aktivitätskonzentration (laut Herstellerangabe): 295 mCi $^{125}\text{J}/\text{ml}$
 Volumen 0,0176 ml

Gesamtaktivität in 0,0176 ml: 5,192 mCi ^{125}J

verdünnt mit 500 μl 0,5 M Phosphatpuffer: 0,5176 ml 5,192 mCi

entnommen für Markierung am 23. 1. 76: 0,05 ml x

$$x = \frac{0,05 \times 5,192}{0,5176} = 0,517 \text{ mCi} \quad (\text{entsprechen } 238\,078 \text{ Impulse})$$

* Es wird angenommen, daß verbliebene Restaktivität markiertes Hormon darstellt, da nur markiertes Protein eine so hohe Glasadsorption aufweist; freies Jod kann fast vollständig aus Ampulle und Pipette ausgespült werden.

Spezifische Aktivität für Glas 5:

238 078 Impulse	0,517 mCi
17 304 "	x

$$x = \frac{17\ 304 \times 0,517}{238\ 078} = 0,0376\ \text{mCi} = 37,6\ \mu\text{Ci} \quad (\text{in Glas 5})$$

Spezifische Aktivität des markierten FSH in Glas 5:

37,6 $\mu\text{Ci}/1,35\ \mu\text{g}$ oder 27,85 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

Markierte Hormonmenge in jedem Inkubationsröhrchen:

Verlust an markiertem Hormon während der 2. Reinigung über Zellulose-Säule:

Gesamtaktivität Glas 5 (0 cm Zählabstand)	408 266 Impulse
Restaktivität Glas 5	8 242 "
Restaktivität Pipette	4 554 "
auf Säule aufgetragen	395 470 "

408 266 Impulse	1,35 μg FSH
395 470 "	x

$$x = \frac{395\ 470 \times 1,35}{408\ 266} = 1,307\ \mu\text{g FSH I/II} \quad (\text{tatsächlich aufgetragene Hormonmenge auf Säule})$$

Immunoreaktives Hormon eluiert mit Pferdeserum: 234 906 Impulse

395 470 Impulse	1,307 μg FSH I/II (aufgetragen)
234 906 "	x (eluiert)

$$x = \frac{234\ 906 \times 1,307}{395\ 470} = 0,776\ \mu\text{g FSH I/II} = 776\ \text{ng FSH I/II}$$

Markierte FSH-Menge in jedem Inkubationsröhrchen:

776 ng FSH I/II verdünnt in 100 ml Albuminpuffer, davon je 0,1 ml
(= 15 321 Impulse/Minute im Wallac-Gamma-Zähler):

$$\begin{array}{rcl} 100 \text{ ml} & 776 \text{ ng FSH} & \\ 0,1 \text{ ml} & \times & x = 0,776 \text{ ng FSH I/II} \end{array}$$

In jedem Inkubationsröhrchen befinden sich während des RIT
0,776 ng markiertes Schaf FSH I/II.

Menge inkorporiertes radioaktives Jod in jedem markierten FSH-Molekül:

Herstellerangabe: Spezifische Aktivität ca. $10 \text{ Ci }^{125}\text{J/mg }^{125}\text{J}$

spezifische Aktivität des markierten FSH: $27,85 \mu\text{Ci }^{125}\text{J}/\mu\text{g FSH I/II}$

folglich je $1 \mu\text{g FSH I/II}$ $2,785 \text{ ng }^{125}\text{J}$ (aus $10 \mu\text{Ci }^{125}\text{J/ng }^{125}\text{J}$)
je 359 ng FSH I/II $1 \text{ ng }^{125}\text{J}$

Berechnung des Molekulargewichtsverhältnisses von FSH und markiertem
Jod:

Molekulargewicht FSH I/II ca. 32 000
Molekulargewicht ^{125}J 126,9

Verhältnis FSH/Jod = 252,16 : 1

folglich: je 1,42 FSH-Moleküle wird ein radioaktiv markiertes Jod-Atom
eingebaut.

2.2.8. Endpunktbestimmung

Alle Verdünnungen im Test (Antiserum, Standard, 2. Antikörper, Plasma- oder Serum-Verdünnungen) werden mit einem 0,05 M Phosphatpuffer, der 18 ‰ EDTA und 0,5 ‰ human Serum-Albumin als Trägerprotein enthält, um Hormonadsorption an Glas- oder Plastikmaterial zu verhindern, ausgeführt. Plasma oder Serum-Proben werden doppelt, Standardverdünnungen werden dreifach in 12 x 75 mm Plastikröhrchen angesetzt.

Standard:	0,1 ml Standardverdünnung (600 - 1 ng)	
	0,2 ml Albumin-Puffer	Gesamtansatz
	0,1 ml Antiserum-Verdünnung (enthält normales Meerschweinchenserum (1 : 300)	0,5 ml
	0,1 ml Verdünnung von markiertem FSH I/II	
Blindwert:	0,3 ml Albumin-Puffer	
	0,1 ml Antiserum	"
	0,1 ml Verdünnung von markiertem FSH I/II	
Leerwert:	0,4 ml Albuminpuffer	
	0,1 ml Verdünnung von markiertem FSH I/II	"
Test:	0,3 ml Plasma oder Serum oder -Verdünnung	
	0,1 ml Antiserum	"
	0,1 ml Verdünnung von markiertem FSH I/II	

Zeitlicher Ablauf:

Nach 24 Stunden Vorinkubation bei 4°C im Kühlschrank werden 0,1 ml Verdünnung von markiertem FSH zugegeben. Nach weiteren 48 - 72 Stunden Inkubation im Kühlschrank werden 0,1 ml präzipitierender Antikörper zupipettiert und weitere 24 Stunden inkubiert; danach werden 1,5 ml 0,05 M Phosphatpuffer zugefügt und die Teströhrchen in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor 30 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, die Röhrchen mit Zell-

stofftupfer ausgewischt und anschließend wird die Impulszahl des Präzipitats in automatischen Gamma-Zählern (LKB-Wallac) ausgezählt.

2.2.9. Computerisierte Testauswertung

Alle Radioimmuntests werden nach einem im Institut modifizierten Programm für eine polynome Regression 5. Grades in einem Wang 720 Tischrechner ausgewertet (Himmeler 1977). Alle Meßdaten des Gamma-Zählgerätes werden zusätzlich auf Lochstreifen gestanzt und über einen optischen Lochstreifenleser dem Tischrechner eingegeben; der Computer berechnet die Standardkurve nach einer Funktion 5. Grades, mit Hilfe eines Plotters kann die Kurve ausgedruckt werden; alle Meßwerte der Plasma- und Serumproben werden automatisch anhand der Standardkurve berechnet und ausgedruckt.

Bei 55 computerberechneten FSH-Tests mit NIH-FSH-B₁-Standard (und mit enzymatisch markiertem FSH) ergab sich eine mittlere absolute Testbindung von $45,2 \pm 10,8$ % ($V_K = 23$ %) und ein mittlerer Wert von 50 % relativer Bindung (50 % "intercept") von 189 ± 54 ng ($V_K = 28$ %); die durchschnittliche untere Nachweisgrenze reproduzierbarer Werte lag bei diesen Tests bei $30,4 \pm 16,9$ ng/ml.

In Abbildung 11 ist die aus allen 55 Tests errechnete mittlere Standardkurve (ausgedrückt in % relativer Bindung) dargestellt, die in Kombination mit den stets mitlaufenden Kontrollproben eine weitere Grundlage für das Erkennen eventueller Fehler während des Testablaufs darstellt. Zum Vergleich sind in Abbildung 12 je eine Individual-Standardkurve für Ambion- und NIH-FSH-B₁-Referenzsubstanz dargestellt.

2.2.10. Gültigkeitskriterien

2.2.10.1. Testgenauigkeit, "Intra-assay"-Variation

Der "intra-assay" Variationskoeffizient wurde als die Variation des Mittelwerts der FSH-Konzentrationen von je 40 parallel

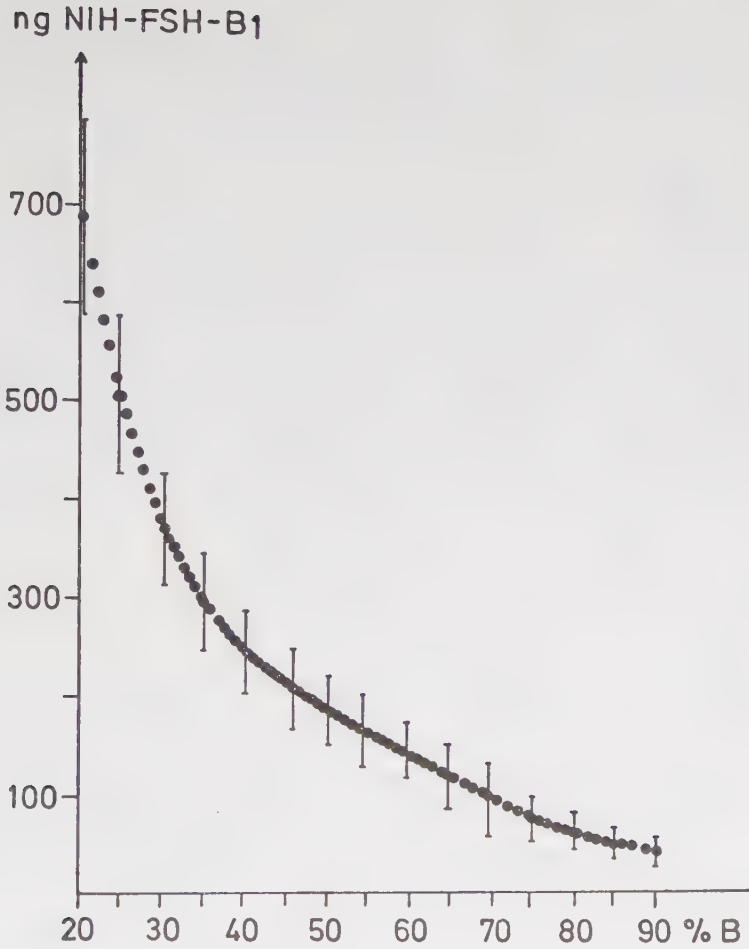


Abbildung 11:

Computerberechnete "Idealstandardkurve" (Mittelwerte mit Standardabweichungen) aus 55 Radioimmunotests mit bovinem Standard NIH-FSH-B₁ (Abszisse: % relative Bindung, Ordinate: ng NIH-FSH-B₁/Ansatz)

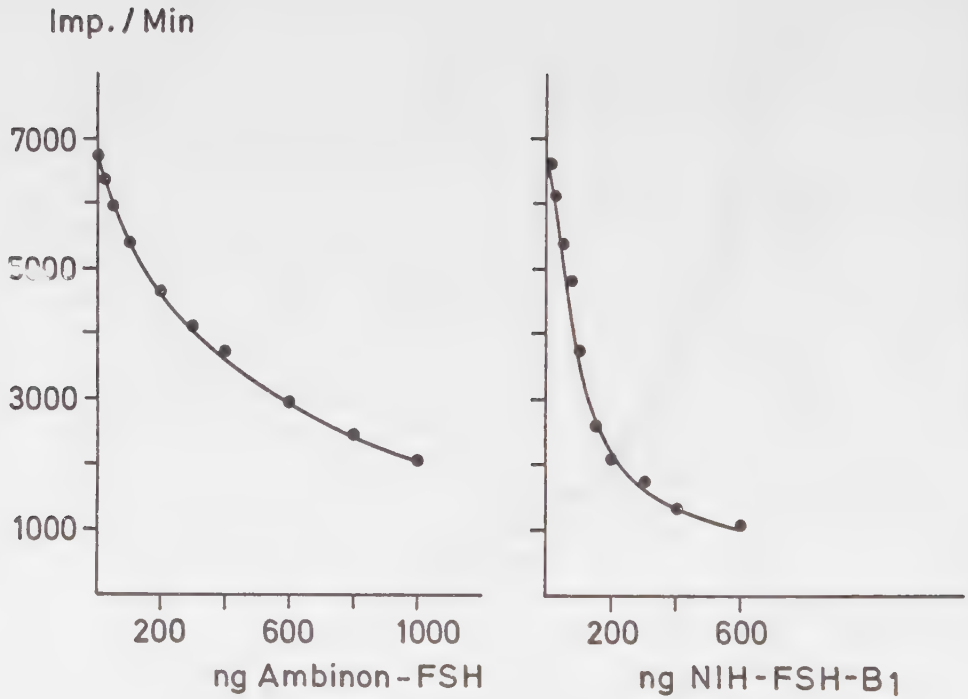


Abbildung 12:

Vergleich von Ambinon- und NIH-FSH-B₁-Standard im Radioimmunotest:
absolute Testbindung 57 %, Antiserumendverdünnung 1 : 30 000,
2. Antikörper 1 : 48 (Abszisse: ng Standard/Ansatz, Ordinate:
Impulse/Minute)

angesetzten Proben mit niedrigem und hohem FSH-Gehalt berechnet; bei 74 ng/ml betrug der Variationskoeffizient 6 % und bei 190 ng/ml 5 %, bestimmt von 2 verschiedenen Personen.

2.2.10.2. Reproduzierbarkeit, "Inter-assay"-Variation

Die "inter-assay"-Variation ist ausgedrückt als das Mittel der Variationskoeffizienten der FSH-Werte von 17 verschiedenen Kontrollproben männlicher und weiblicher Rinder (siehe Tabelle 6) mit niedrigem, mittlerem und hohem endogenem FSH-Gehalt, die in jedem Test als Kontrollen für die Reproduzierbarkeit des Systems mit angesetzt wurden; das Mittel der Variation betrug 11,8 % in 55 Tests. Die Schwankungen waren in allen Konzentrationsbereichen etwa gleich, so daß daraus auf eine Konstanz der Standardkurve geschlossen werden kann.

2.2.10.3. Wiederfindung von zugesetztem FSH

Zur Abklärung, ob eventuell Serum- oder Plasmabestandteile in diesem Radioimmotest interferieren, wurden zu 200 µl Serum oder Plasma mit bekanntem niedrigem und hohem endogenem FSH-Gehalt steigende Mengen von FSH-Standard-Hormon (Ambion-FSH oder NIH-FSH-B₁) zugesetzt und die wiedergefundene FSH-Menge ermittelt. Die Resultate sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die mittlere Wiederfindung aller Experimente betrug $101,7 \pm 7,7$ %, der Variationskoeffizient 7 %. Die Linearität und Parallelität der wiedergefundenen FSH-Mengen eines einzelnen Experiments mit drei verschiedenen Rinderplasma-Proben ist in Abbildung 13 dargestellt.

Tabella 6:

Reproduzierbarkeit von unverdünnten Rinder-Plasma- und -Serum-
Kontrollproben im Radioimmunotest

Kontroll- probe	Tests (n)	NIH-FSH-B ₁ -Konzentrationen $\bar{x} \pm s$ (ng/ml)		Variations- koeffizient (%)
Bulle II	10	111,9	13,6	12,2
Bulle IV	32	139,2	20,6	14,8
Bulle V	19	122,3	12,0	9,8
Bulle VI	22	206,8	31,6	15,3
Bulle VII	23	226,1	38,0	16,8
Kuh Adria	20	221,7	21,7	9,8
Kuh Eva	26	181,3	31,0	17,1
Bulle Gilch	25	138,6	13,9	10,0
Kuh Helga	5	247,0	25,9	10,5
Kuh Isa	5	336,2	33,6	10,0
Bulle Kabine	50	221,7	22,8	10,3
Bulle Kaliro	27	173,2	23,8	13,8
Kalbin Klara	26	103,6	15,1	14,6
Kuh Leila	7	376,1	30,1	8,0
Kuh Marple	5	375,5	18,1	4,8
Bulle Wastl	21	231,0	18,9	8,2
Kuh Ypsilon	24	124,6	18,1	14,5

Tabelle 7:

Wiederfindung von bovinem FSH (AMBINON-FSH oder NIH-FSH-B₁)
 zugesetzt zu 200 µl Plasma oder Serum

FSH-Zusatz (ng)	Anzahl Experimente	Wiedergefundenes FSH		Variationskoeffizient (%)
		$\bar{x}$	$\pm s$ (%)	
25	9	96,5	4,8	6
50	5	94,8	6,7	7
100	5	97,8	8,4	8
200	14	101,7	7,9	7
300	4	104,3	7,3	6
400	4	115,5	14,5	12

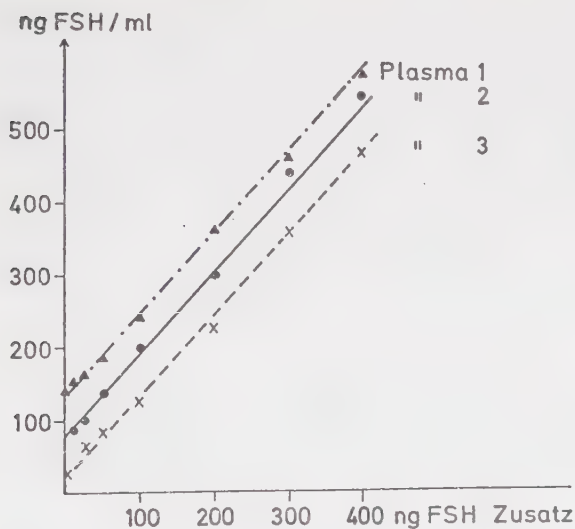


Abbildung 13:

Wiederfindung von zugesetztem FSH aus 3 Rinderplasmapools

2.2.10.4. Parallele Reaktion von endogenem und exogenem FSH

In einer Reihe von Experimenten wurden Proben mit hohem bekanntem FSH-Gehalt in unterschiedlichen Verdünnungsstufen getestet (Konzentration von 10 - 300 μ l Plasma/Teströhrchen) und der Abfall der Bindung mit steigender Hormonkonzentration mit der Standardkurve verglichen. In einem Experiment (siehe Abbildung 14) ließen sich folgende Regressionsgleichungen für die Standardkurve ($y = -2,07 \times + 978$) und für je eine Plasmaverdünnung eines weiblichen ($y = -2,07 \times + 496$) und eines männlichen ($y = -2,09 \times + 555$) Rindes aufstellen; alle 3 Kurven zeigen eine gute Parallelität.

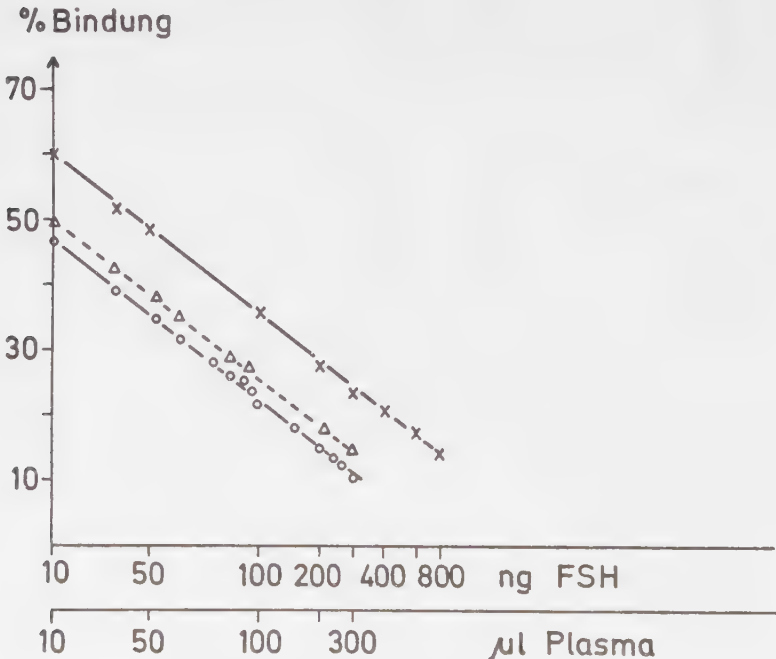


Abbildung 14:

Parallelität der Regressionskurven von endogenem und exogenem FSH:

x — x Standard NIH-FSH-B₁, Δ --- Δ Plasmaverdünnungskurve (männliches Tier), o — o Plasmaverdünnungskurve (weibliches Tier)

3. PHYSIOLOGISCHE ERGEBNISSE

3.1. Versuchstiere, Blutproben, durchgeführte Versuche

Das Tiermaterial der jeweiligen Versuche ist nach Geschlecht, Alter, Rasse und Standort in den Tabellen im Anhang vorgestellt; zusätzlich sind der zugehörige Versuch und die Anzahl der gewonnenen Blutproben verzeichnet.

Blutentnahmen:

Die Blutentnahmen geschehen teilweise durch Punktion der Vena jugularis; frequentere Probennahmen erfolgen mit Hilfe von Plastikkathetern, die in der Regel einen Tag vor dem Versuchsbeginn in die Vena jugularis eingelegt werden und bis zu drei Wochen liegen bleiben; zur Verhinderung einer Blutgerinnung wird mit Heparin-NaCl-Lösungen (Konzentration 300 I.E./ml) gespült.

Blutplasma:

Die Blutproben (10 - 20 ml/Entnahme) wurden anfangs in Glaszentrifugenröhrchen, die 0,1 ml einer Heparin-Lösung (12,5 USP-E Liquemin^R, Hoffmann-La Roche/0,1 ml phys. NaCl) enthielten, gesammelt, maximal 30 Minuten gekühlt aufbewahrt und bei 2800 x g abzentrifugiert. Das überstehende Plasma wird dekantiert und in 10 ml Plastikröhrchen (Fa. Sarstedt) bei -18°C bis zum Test gelagert. Ab 1974 wurden die Blutproben in mit Ammoniumheparinat beschichteten und spezielles Polystyrol-Granulat enthaltende 10 ml Einmalplastikröhrchen (Fa. Sarstedt) gesammelt; weitere Aufarbeitung wie beschrieben.

Blutserum:

Um Fibrinbildung, die beim Pipettieren während des Tests stark stört, weitgehend zu vermeiden, wurde ab Frühjahr 1976 generell nur noch Blutserum gewonnen; die Proben wurden in speziellen mit Polystyrolgranulat ausgestatteten und kaolinbeschichteten 10 ml Einmal-Plastikröhrchen (Fa. Sarstedt) gesammelt, für die Fibrinbildung 30 Minuten gelagert und wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

Durchgeführte Versuche:

Ein Großteil der beschriebenen Tierexperimente wurde im Rahmen intensiver Teamarbeit durchgeführt oder es wurden von schon vorhandenen Blutproben früherer Versuche noch zusätzlich die Follicitropin-Werte bestimmt, um eine möglichst komplette "Hormonpartitur" erstellen zu können. Die vorgestellten physiologischen Ergebnisse sollen insbesondere FSH-Basalwerte und Veränderungen in den FSH-Konzentrationen nach bestimmten biotechnischen Manipulationen beschreiben.

3.2. Bestimmung der biologischen Halbwertszeit (HWZ)

Um Hormonspiegel im peripheren Blut beurteilen zu können, ist es wichtig, Anhaltspunkte für die Verweildauer des Hormons im peripheren Blut zu besitzen. Die HWZ von bovinem FSH wurde nach exogener Zufuhr von FSH-Standardsubstanz und nach endogen auftretenden FSH-Gipfeln bestimmt.

Biologische Halbwertszeit nach exogen zugeführtem FSH

Einem Bullen wurde über einen eingelegten Jugulariskatheter 20 mg NIH-FSH-B₁-Standardsubstanz (frisch gelöst in 10 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,4, und verdünnt ad 1000 ml phys. NaCl) eine Stunde lang infundiert. Vor Infusionsbeginn wurden während 60 Minuten 7 Kontrollproben genommen, während der Infusion wurden alle 10 Minuten Proben gezogen, nach Infusionsende 2 Stunden lang in 5-minütigem, danach in 10-minütigem Abstand.

Der Verlauf der FSH-Werte im Jugularisblut ist in Abbildung 15 dargestellt. Von durchschnittlich 179 ng FSH/ml in den Kontrollproben steigt die Konzentration kontinuierlich während der Infusion bis auf 868 ng/ml 5 Minuten vor Infusionsende an, um anschließend sofort wieder abzufallen, ohne vorher ein Plateau auszubilden. Der Abfall der Follitropin-Kurve läßt sich in 2 Komponenten untergliedern, für die sich Halbwertszeiten von 35 Minuten bzw. 130 Minuten errechnen ließen.

Halbwertszeit von endogenem FSH

Als Berechnungsgrundlage dienen hier 2 endogene FSH-Peaks¹ von weiblichen Tieren, einmal nach Injektion von 1500 µg GnRH bei einer Kalbin nach Corpus luteum-Enukleation, zum anderen ein endogener FSH-Peak während eines Tagesrhythmusversuchs bei einer Kuh; in beiden Fällen sind die Blutproben durch Venenkatheter alle 15 Minuten gezogen worden. Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnte auch hier ein Abfall der FSH-Werte, unterteilt in 2 Komponenten, gefunden werden; nach Releasinghormon-Gabe errechneten sich Komponenten von biologischen Halbwertszeiten von 43 bzw. 116 Minuten, der zweite endogene Peak wies Halbwertszeiten von 34 und 136 Minuten auf.

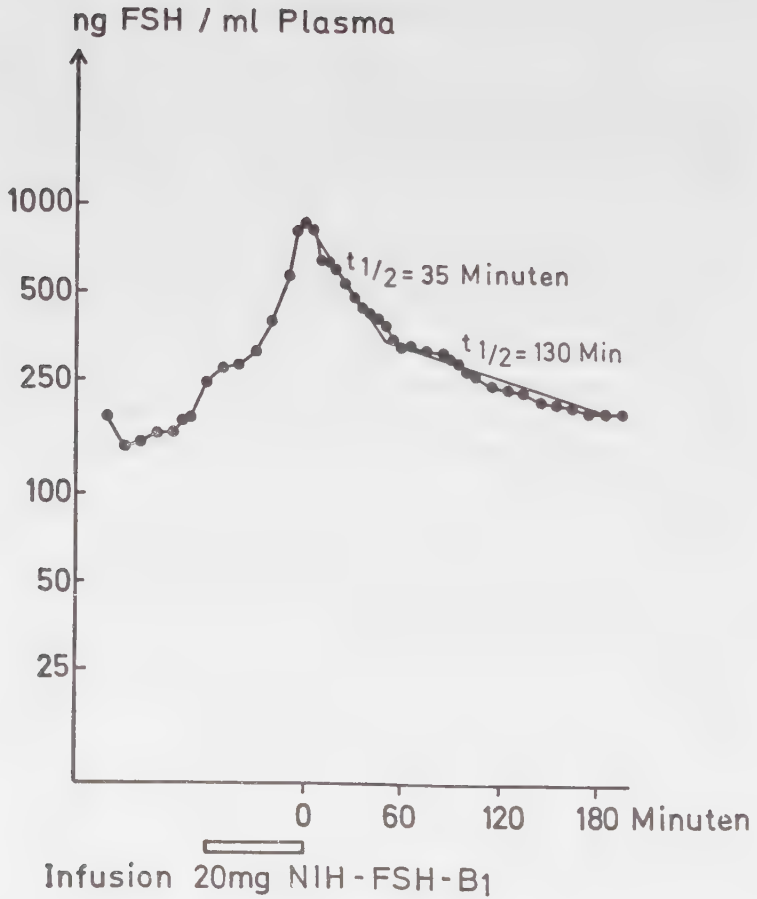


Abbildung 15:

Bestimmung der biologischen Halbwertszeit von exogen zugeführtem FSH bei einem Bullen (20 mg NIH-FSH-B₁ infundiert in 60 Minuten)

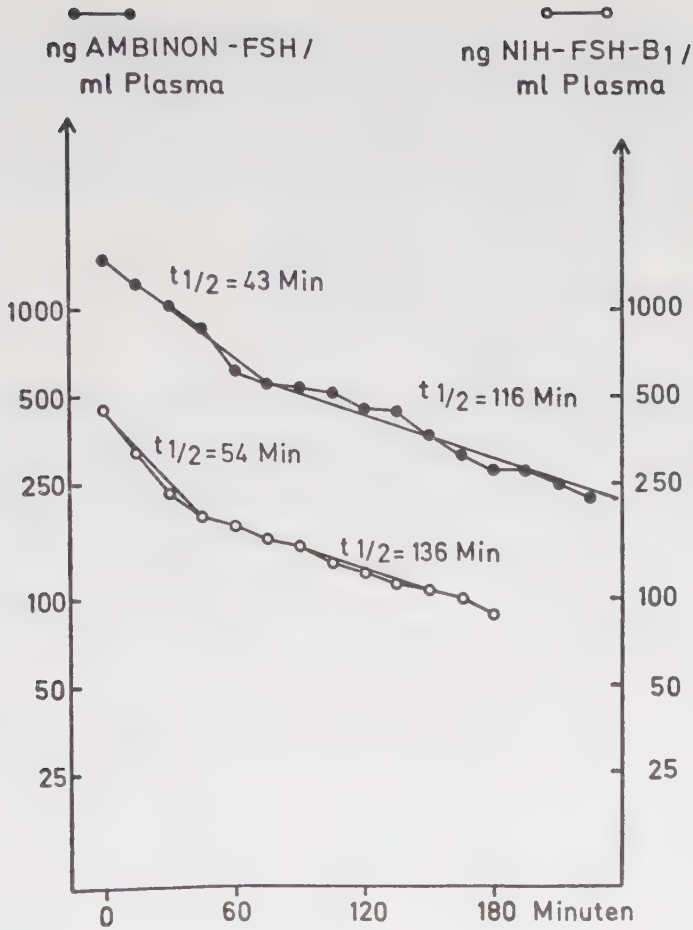


Abbildung 16:

Bestimmung der biologischen Halbwertszeit von endogenem FSH bei 2 weiblichen Rindern

- nach Gelbkörper-Enukleation und Injektion von 1500 µg GnRH i.m. (Standard: Ambinon-FSH = 0,33 x NIH-FSH-B₁)
- endogener FSH-"Peak" (Standard: NIH-FSH-B₁)

Das Mittel der beiden Bestimmungen vom endogenen FSH-Peak¹ stimmt gut mit den Werten des exogen zugeführten Hormons überein, was sich auch am Mittelwert aller 3 Experimente für die biologische Halbwertszeit von Rinder-FSH ausdrückt: Komponente I errechnete sich mit durchschnittlich 38 Minuten, Komponente II mit durchschnittlich 127 Minuten Dauer.

3.3. Diurnale bzw. episodische Sekretion

Bei erwachsenen Tieren

An 7 erwachsenen Tieren wurden Intensivversuche zur Überprüfung eventueller episodischer Sekretion durchgeführt (siehe Tabelle 8). Den Bullen "Kaliro" und "Gilch" und den Kühen "Peppa" und "Wanda" wurde Blut mit Hilfe von Jugularis-Dauerkathetern unter Sichtkontrolle direkt im Stall entnommen, wohingegen bei den Kalbinnen "Kathl", "Korona" und "Ciba" nach einer mehrtägigen Eingewöhnungszeit in einem speziellen Versuchstall Blutproben über lange Schlauchsysteme von einem abgetrennten Raum aus gezogen wurden, so daß die Tiere vollkommen von Manipulationen unbeeinflusst blieben.

In Abbildung 17 sind die Experimente mit einer Versuchsdauer von 23 bis 33 Stunden zusammengefaßt: der Bulle "Kaliro" weist die relativ konstantesten Werte auf, die im Mittel um 276 ± 29 ng Ambion-FSH/ml pendeln. Die Kalbin "Kathl" zeigt ein äußerst konstantes Ausgangsniveau, während des ersten Tages treten nur FSH-Erhöhungen von maximal 30 Minuten Dauer auf, während des 2. Tages erscheinen markante Erhöhungen bis zum 6-fachen Ausgangsniveau und bis zu 2 Stunden Dauer. Die Kuh "Wanda" zeigte bei Versuchsbeginn noch deutliche Brunstsymptome, die FSH-Werte weisen aber dennoch konstantes Basalniveau auf, wobei 8 kurzzeitige Erhöhungen von 15 bis 30 Minuten Dauer auffallen. Bei der Kuh "Peppa" ragen 3 markante Gipfel von 75 bzw. 90 Minuten Dauer auf. In Abbildung 18 sind die Versuche mit 48 - 50 Stunden Dauer zusammengefaßt: der Bulle "Gilch" weist zwei getrennte Sekretionsphasen auf; bis Mitternacht des ersten Tages treten 30- bis 45-minütige Gipfel auf, die bis zu 5-fache Basalwerte erreichen können, dagegen sind die

Tabelle 8:

Tagesrhythmusversuche bei erwachsenen Tieren

Tier	Geschlecht	Alter (Jahre)	Versuchsdauer (Stunden)	Blutentnahmefrequenz (Minuten)	Bemerkungen
Kaliro	männlich	3	32	15	-
Gilch	"	1 1/2	48	15	-
Korona	weiblich	2	48	15	5 Wochen gravid
Kathl	"	2	33	15	7 Wochen gravid
Ciba	"	2	50	10	12 Wochen gravid
Peppa	"	3	23	15	14. Zyklustag
Wanda	"	3	30	15	19. Zyklustag (Brunst)

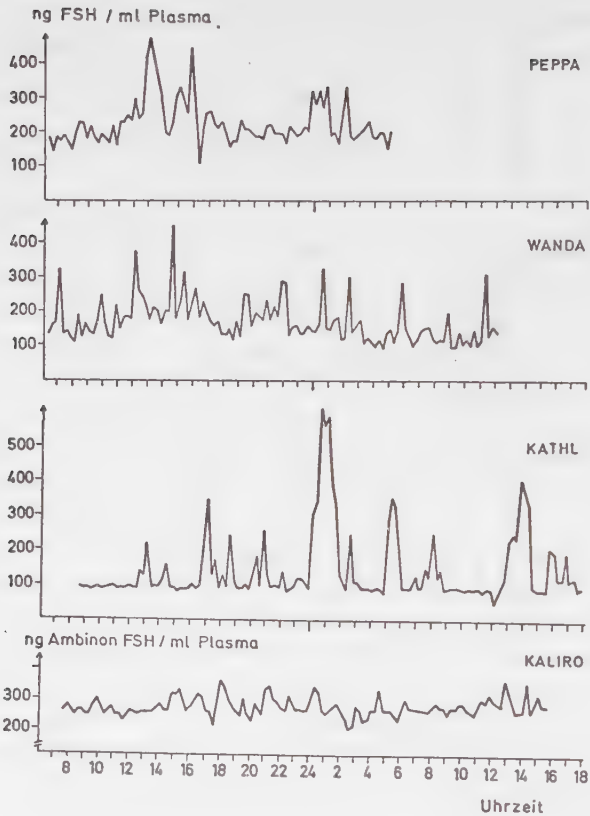


Abbildung 17:

Episodische FSH-Sekretion bei 3 weiblichen und 1 männlichen Rind während eines Zeitraumes von 23 bis 33 Stunden mit 15-minütiger Blutentnahmefrequenz

("Kaliro": Ambinon-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

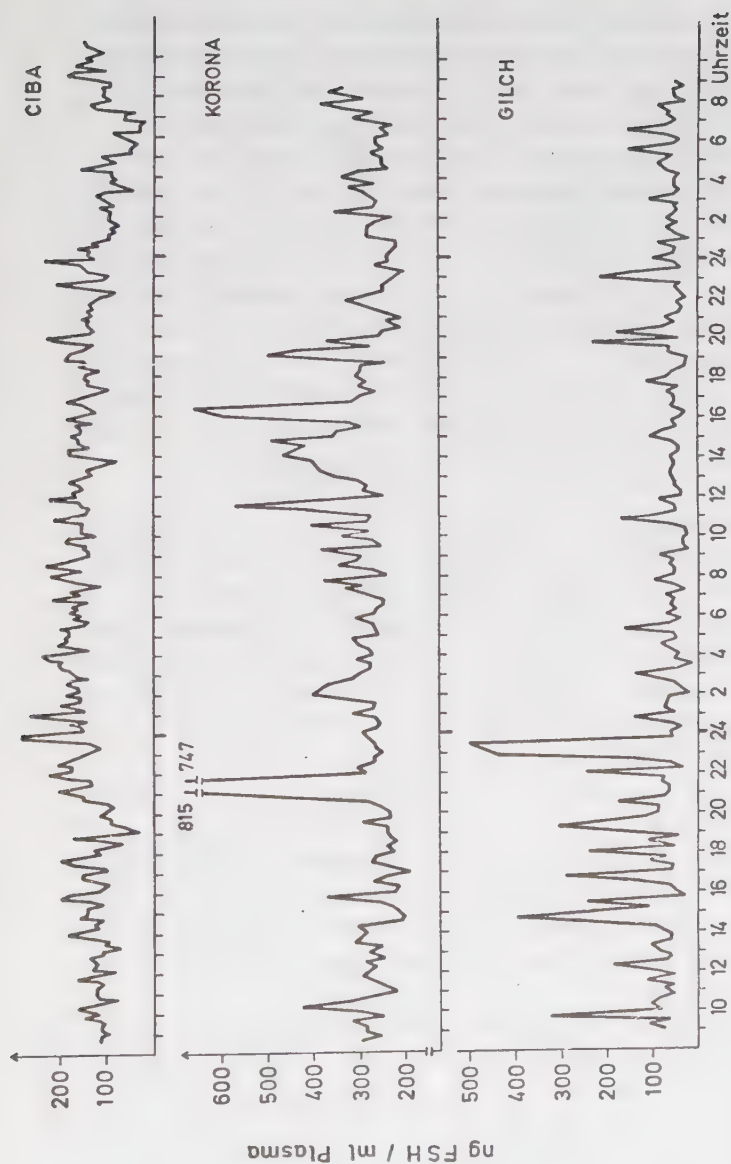


Abbildung 18:

Episodische FSH-Sekretion bei 2 Kalbinnen und einem Bullen während eines Zeitraumes von 48 bis 50 Stunden mit 10- bzw. 15-minütiger Blutentnahmefrequenz

Fluktuationen in den folgenden 33 Stunden wesentlich niedriger und seltener. Die Kalbin "Korona" zeigt während des ersten und letzten Versuchsabschnitts die geringsten Schwankungen, allerdings liegt das Ausgangsniveau bei diesem Tier bei annähernd 300 ng/ml wesentlich höher als bei allen übrigen Tieren. Die Kalbin "Ciba" mit der frequentesten und am längsten andauernden Blutentnahme hat einen relativ engen Schwankungsbereich, jedoch erhöhen sich die FSH-Werte am Abend des ersten Tages um fast 70 ng/ml, um 27 Stunden lang mit ähnlicher Schwankungsbreite wie am ersten Versuchstag zu fluktuieren. Es konnten keine gemeinsamen FSH-Sekretionscharakteristika gefunden werden, jedoch fanden sich bei fast allen Tieren zwei Arten von FSH-Erhöhungen: kurzzeitige 15, höchstens 30 Minuten dauernde "Spikes", die selten über doppeltes Ausgangsniveau hinausragen und bis zu 2 Stunden sich dehnende Erhöhungen, die oft die doppelte Höhe der Kurzzeitschwankungen erreichen.

Altersabhängigkeit

Jeweils 2 männlichen und 2 weiblichen Kälbern mit 4, 8, 20 und 40 Wochen Alter wurden 8 Stunden lang in 15-minütigem Abstand mit Dauerkathetern Blut entnommen, um eine eventuelle Altersabhängigkeit einer episodischen FSH-Sekretion zu ermitteln. In einer zweiten Versuchsserie wurden je 2 weiblichen Kälbern mit 8/9 Wochen Alter und 35/36 Wochen Alter in 6-stündigem Abstand 12 Tage lang Blut mit Dauerkathetern entnommen.

Bei männlichen Kälbern:

Während dieser 8-stündigen Versuche (siehe Abbildung 19) zeigten die Kälber mit 4 und 8 Wochen Alter (wegen zu geringer Blutmengen konnte mit 4 Wochen nur bei einem Tier und mit 8 Wochen bei dem 2. Tier nur ein unvollständiges Hormonprofil erstellt werden) Tagesschwankungen von maximal 100 ng/ml; dieser Ausschlag wurde bei den älteren Tieren auch nicht überschritten. Die kurzzeitigen FSH-Erhöhungen oder Erniedrigungen während des Tages hatten eine maximale Dauer von 45 Minuten, meist nur von 15 bis 30 Minuten.

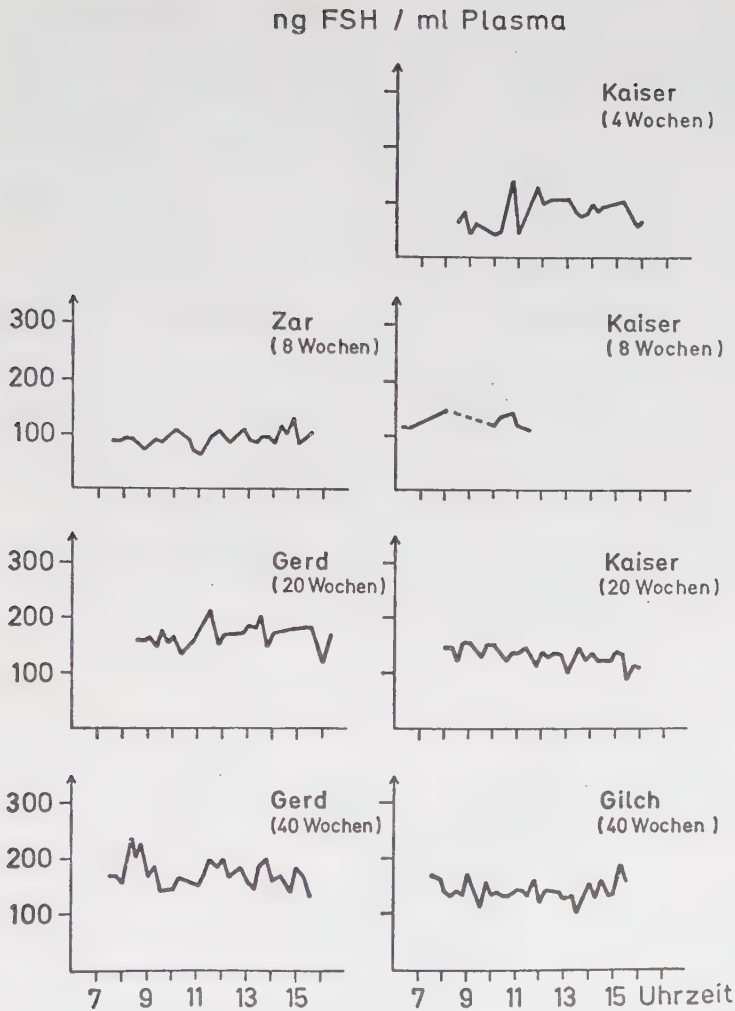


Abbildung 19:

Altersabhängigkeit einer episodischen FSH-Sekretion bei männlichen Kälbern mit 4, 8, 20 und 40 Wochen Alter während einer jeweils 8-stündigen Versuchsperiode

Bei weiblichen Kälbern:

Die weiblichen Kälber (Abbildung 20) zeigten grundsätzlich das gleiche Sekretionsmuster wie die männlichen Tiere; 6 - 8 kurzzeitige Erhöhungen oder Erniedrigungen während des 8-stündigen Untersuchungszeitraumes ließen sich nachweisen. Das Niveau der weiblichen Tiere wies gegenüber dem der männlichen signifikant höhere Werte auf ($p < 0,005$) mit Ausnahme des Kalbes "Kleva" mit 20 Wochen Alter; das Kalb "Klara" mit 40 Wochen Alter wies die ausgeprägtesten und am längsten andauernden FSH-Anstiege auf, welche ein Maximum von ca. 150 ng/ml erreichten.

Vergleich der FSH-Spiegel während der 8. - 9. und 35. - 36. Lebenswoche:

Es konnte kein Unterschied im Sekretionsmuster beider Altersstufen gefunden werden (siehe Abbildung 21). Alle 4 Tiere zeigten teilweise bis zu 24 Stunden anhaltenden Anstieg und Abfall der Werte, insbesondere die Kälber "Nora" vom 8. bis 12. Versuchstag, "Karola" am 4. und vom 8. bis 11. Tag und "Kleva" vom 5. bis 8. Tag. Das Kalb "Klara" ließ eine annähernd zweitägige Periodizität erhöhter FSH-Werte erkennen. Die Maximalschwankungen erreichten innerhalb eines Zeitraumes von 8 Stunden bis zu 200 ng/ml.

3.4. Pubertätsversuche bei männlichen Tieren

Langzeitstudie

Von 4 männlichen Rindern wurde vom Tage der Geburt bis zum Alter von 19, 22 bzw. 24 Monaten dreimal wöchentlich durch Punktion der V. jugularis Blut entnommen. Bei den Tieren Kabine, Kaliro und Nydo (siehe Abbildung 22) lagen die FSH-Werte zur Geburt bei etwa 200 ng AMBINON-FSH/ml, sie zeigten bis zur 31. Woche geringe Schwankungen und lagen nie höher als 300 bzw. 400 ng/ml, mit der Ausnahme eines einzelnen Extremwerts bei Kaliro in der 7. Woche. Das Kalb Lado wies einen völlig anderen Verlauf der FSH-Werte auf: bis zur 56. Woche können hier 7 ca. 8 Wochen andauernde Perioden unterschieden werden, je 4 mit hohen und stark streuenden (1. - 8., 17. - 24., 33. - 40. und 49. - 56. Woche) und je 3 mit relativ niedrigen und konstanten

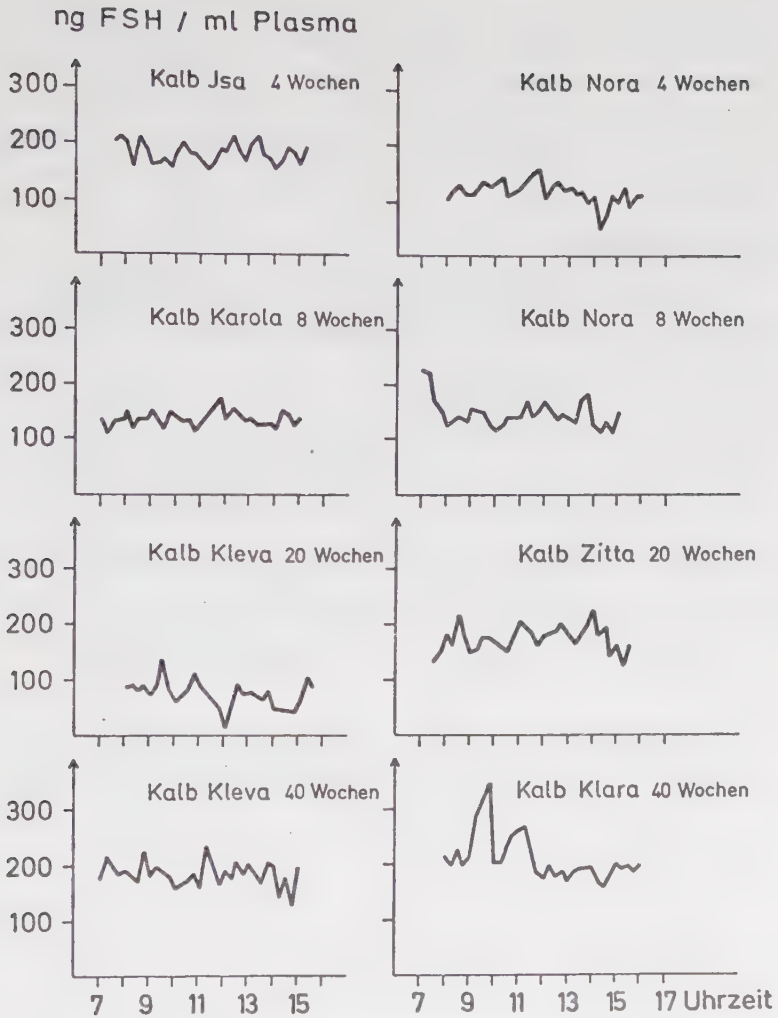


Abbildung 20:

Altersabhängigkeit einer episodischen FSH-Sekretion bei weiblichen Kälbern mit 4, 8, 20 und 40 Wochen Alter während einer jeweils 8-stündigen Versuchsperiode

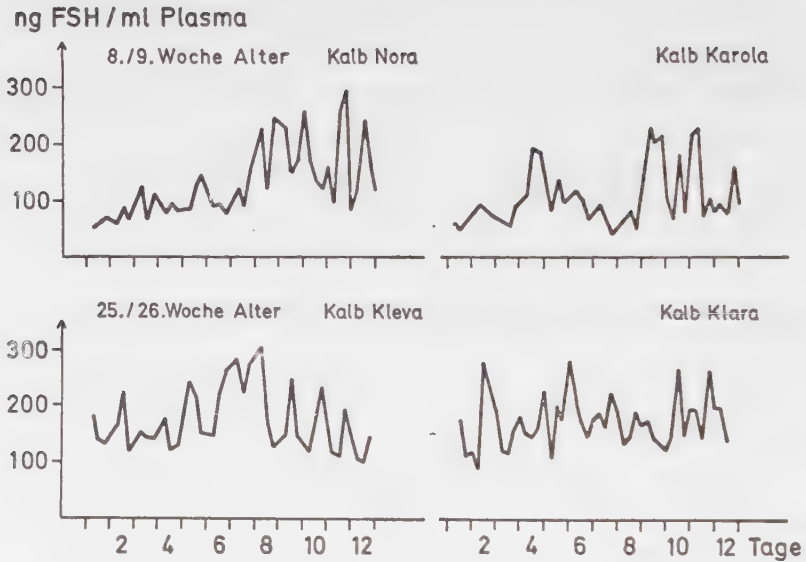


Abbildung 21:

Vergleich einer episodischen FSH-Sekretion bei weiblichen Kälbern in der 8. - 9. und 35. - 36. Lebenswoche während einer jeweils 12-tägigen Versuchsperiode mit 6-stündiger Blutentnahmefrequenz

Follitropin-Werten (9. - 16., 25. - 32. und 41. - 48. Woche); die deutlichen Unterschiede zwischen den Phasen mit hoher und niedriger Aktivität nivellieren sich mit steigendem Lebensalter. Beim Tier Nydo streuen die Werte zwischen der 32. - 38. und der 60. - 66. Woche deutlich stärker. Das Basisniveau steigt langsam von ca. 200 ng/ml bei der Geburt auf ca. 400 ng/ml mit 100 Wochen Alter an. Ausgeprägt stark streuende FSH-Werte finden sich beim Kalb Kabine von der 33. - 45. Woche und von der 52. - 60. Woche, auch hier erhöhen sich die FSH-Werte während der 84 Versuchswochen von ca. 220 ng/ml auf ca. 500 ng/ml. Eine deutliche Erhöhung des Basisniveaus ist bei Kalb Kaliro ab der 46. Lebenswoche zu bemerken, auch hier lagen mit 84 Wochen die Basiswerte doppelt so hoch wie bei der Geburt. Von der 61. - 95. Lebenswoche zeigt der Bulle Lado extrem konstante FSH-Werte um 300 ng/ml; bei diesem Tier konnte keine generelle Tendenz eines Anstiegs der FSH-Werte mit steigendem Alter gefunden werden. Faßt man alle Messungen während der einzelnen Monate zusammen (Abbildung 23), so zeigt sich mit Ausnahme des Kalbes "Lado" deutlich ein biphasiger FSH-Anstieg, der beim sich spät entwickelnden Kalb "Kaliro" später einsetzt, allerdings danach deutlicher ausgeprägt ist als beim Kalb "Nydo".

Kurzzeitversuch:

Acht männlichen Rindern wurde auf dem Versuchsgut Wildschwaige^{*)} in der Zeit vom 3. - 8. Lebensmonat ebenfalls 3 x wöchentlich Blut entnommen. Bedingt durch die nur 6-monatige Versuchsdauer sind Interpretationen der individuellen FSH-Spiegel schwieriger, deshalb wurden die durchschnittlichen monatlichen FSH-Werte aus allen 8 Tieren (mit positiver Standardabweichung) in Abbildung 24 zusammengefaßt. Werden die errechneten FSH-Mittel des dritten und 4. Lebensmonats mit denen des 7. und 8. Monats verglichen, so ergibt sich eine hochsignifikante Erhöhung der durchschnittlichen Follitropinspiegel ($p < 0,005$).

^{*)} Dem Institut für Tierzucht des Fachbereichs Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München (Vorstand: Prof. F. Pirchner, Ph.D.) sei für die Überlassung der Blutproben gedankt.

ng Ambinon-FSH / ml Plasma

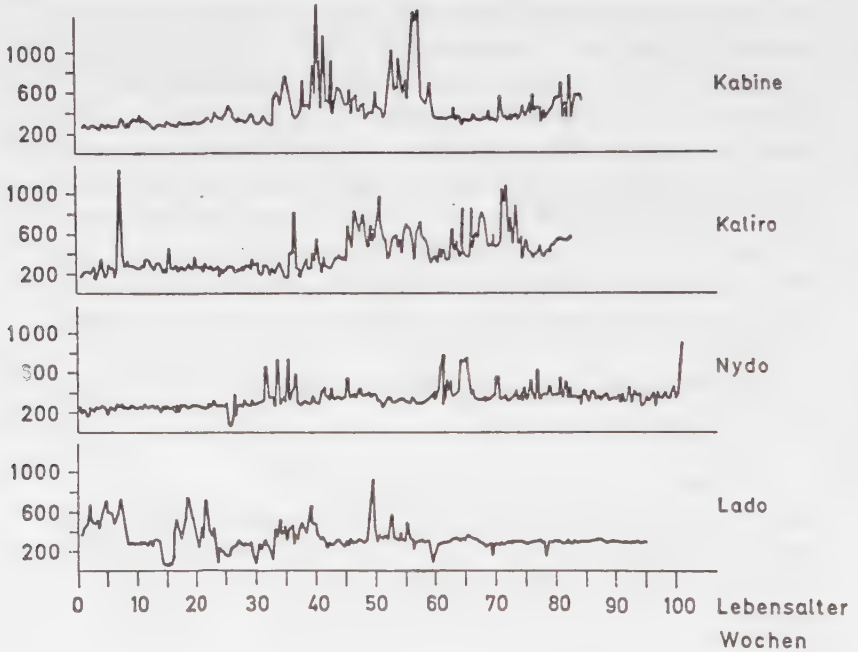


Abbildung 22:

Pubertätsversuch - Langzeitstudie bei 4 Bullen:

FSH-Individualwerte von der Geburt bis 102 Wochen Alter
(wöchentlich dreimalige Blutentnahme)

(Ambinon-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

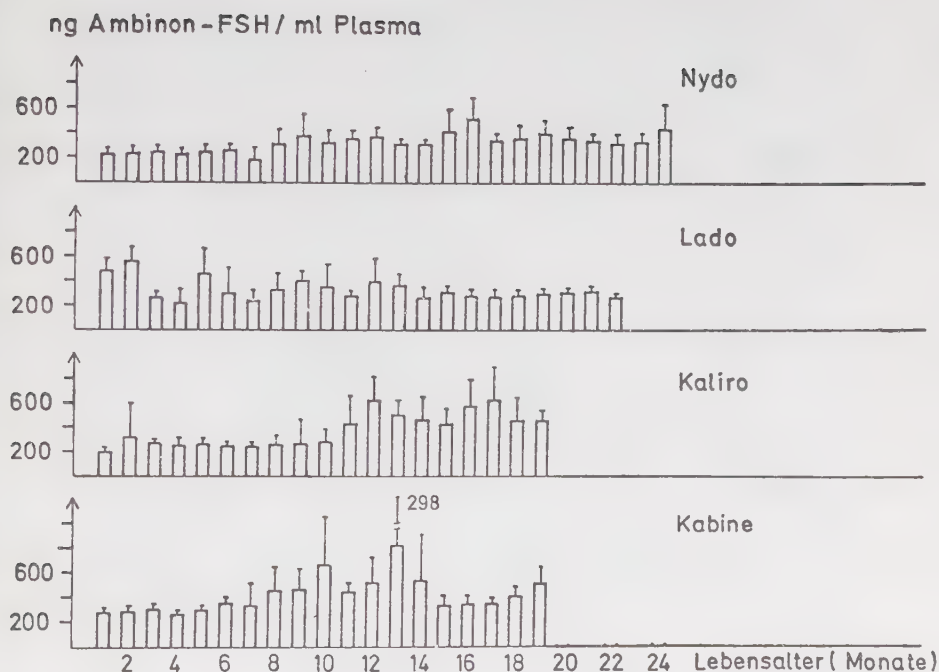


Abbildung 23:

Pubertätsversuch - Langzeitstudie:

monatliche FSH-Mittelwerte (mit positiver Standardabweichung)

bei 4 Bullen

(Ambinon-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

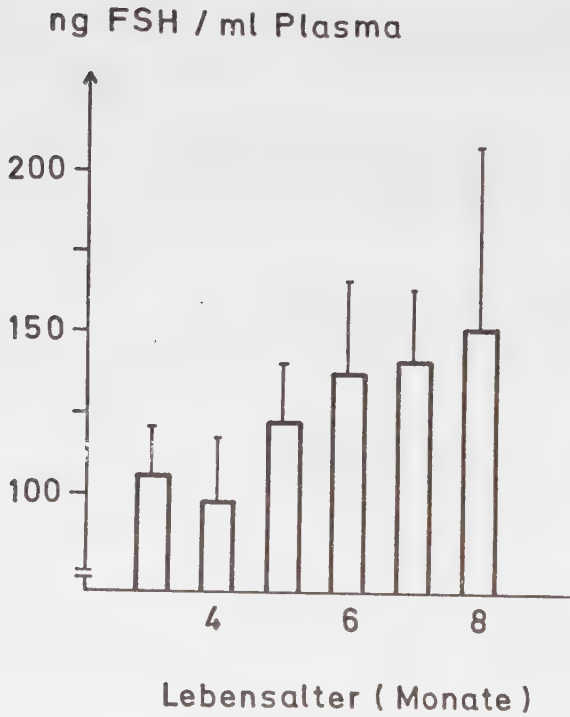


Abbildung 24:

Pubertätsversuch - Kurzzeitstudie: monatliche FSH-Mittelwerte
(mit positiver Standardabweichung) errechnet von 8 Bullen im
Alter von 3 - 8 Monaten

3.5. Pubertätsversuche bei weiblichen Tieren

Fünf weibliche Rinder wurden von der Geburt bis zur 55. bzw. 70. Woche analog den männlichen Tieren 3 x wöchentlich punktiert. Im Gegensatz zu den männlichen zeigten diese 5 weiblichen Tiere keine generelle Tendenz steigender FSH-Werte mit zunehmendem Alter (Abbildung 25); die Werte während der ersten Lebenstage entsprechen ungefähr denen bei Versuchsende. Außer beim Tier Kakwi sind die FSH-Spiegel generell unruhiger, mit häufigeren kurzzeitigen Erhöhungen. Eine Periode oszillierender FSH-Werte, die den Ausgangswert um das 3 - 4 fache überlegen, finden sich bei Kalb Rokpe von der 5. - 15. Woche und von der 27. - 31. Woche, dazwischen sind die Hormonspiegel ziemlich gleichförmig niedrig; die erste wahrnehmbare Brunst trat in der 42. Woche auf. Das Kalb Kalma zeigt bis zur 26. Woche etwa gleichartig schwankende Werte, teilweise an der unteren Test-Nachweisgrenze mit leichter steigender Tendenz, bis zur 47. Woche (erste sichtbare Brunst) häufen sich kurzzeitige Erhöhungen, die sich teilweise bis zu einer Woche lang nachweisen lassen, nach dieser Periode zeigen die Plasmaswerte eher fallende Tendenz. Einen mehr wellenartigen Verlauf weisen die FSH-Plasmakonzentrationen beim Tier Roki auf; von der 5. - 34. Woche verläuft die erste FSH-"Welle", während der folgenden 4 Wochen liegen die Werte niedriger als die untere Nachweisgrenze des RIT von 30 ng/ml, die nächste Welle hat eine 20-wöchige Dauer, ab der 60. Woche zeigt dieses Tier regelmäßige Brunst. Vermehrte "Spikes" bei Roschli treten von der 5. - 13. Woche und dann wieder von der 35. - 40. Woche auf, in der 41. Woche findet die erste deutliche Brunst statt, nachdem schon in der 32. und 36. Lebenswoche brunstähnliche Erscheinungen beobachtet wurden. Abgesehen von Extremwerten in der 32. und 33. Woche weist das Kalb "Kakwi" relativ geringschwankende Follicotropin-Werte auf, ein regelmäßiger Zyklus konnte bei diesem Tier ab der 45. Woche beobachtet werden. Außer den relativ konstanten Basiswerten fallen bei diesen 5 Kalbinnen kaum Gemeinsamkeiten auf, vor allem konnte keine regelmäßig erhöhte FSH-Aktivität vor der ersten Brunst gefunden werden. Werden die Werte eines jeden Lebensmonats gemittelt und mit ihrer jeweiligen Standardabweichung dargestellt (Abbildung 26), so zeigen alle

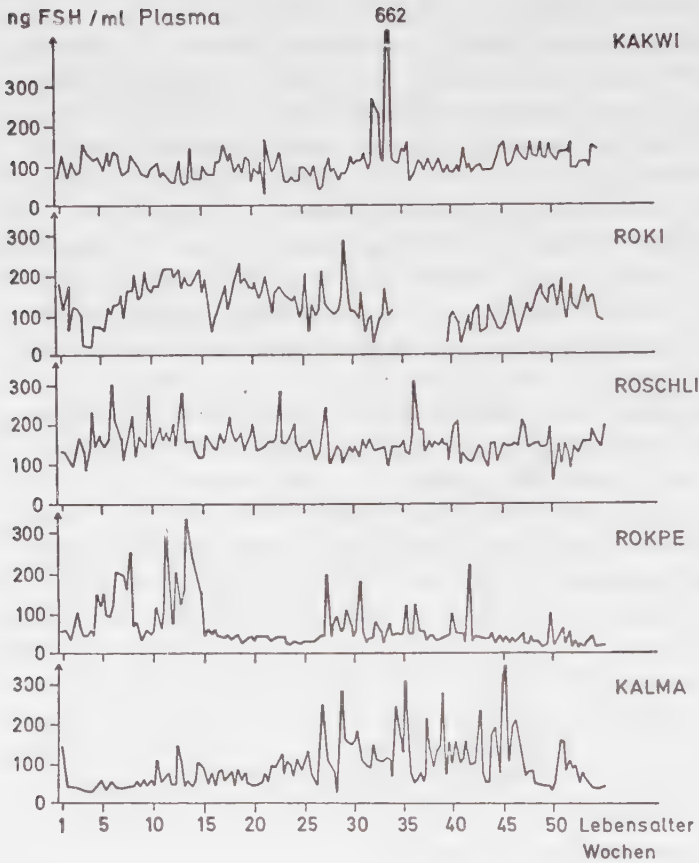


Abbildung 25:

Pubertätsversuch - Langzeitstudie bei 5 Kalbinnen:
FSH-Individualwerte von der Geburt bis 55 Wochen Alter
(wöchentlich dreimalige Blutentnahme)

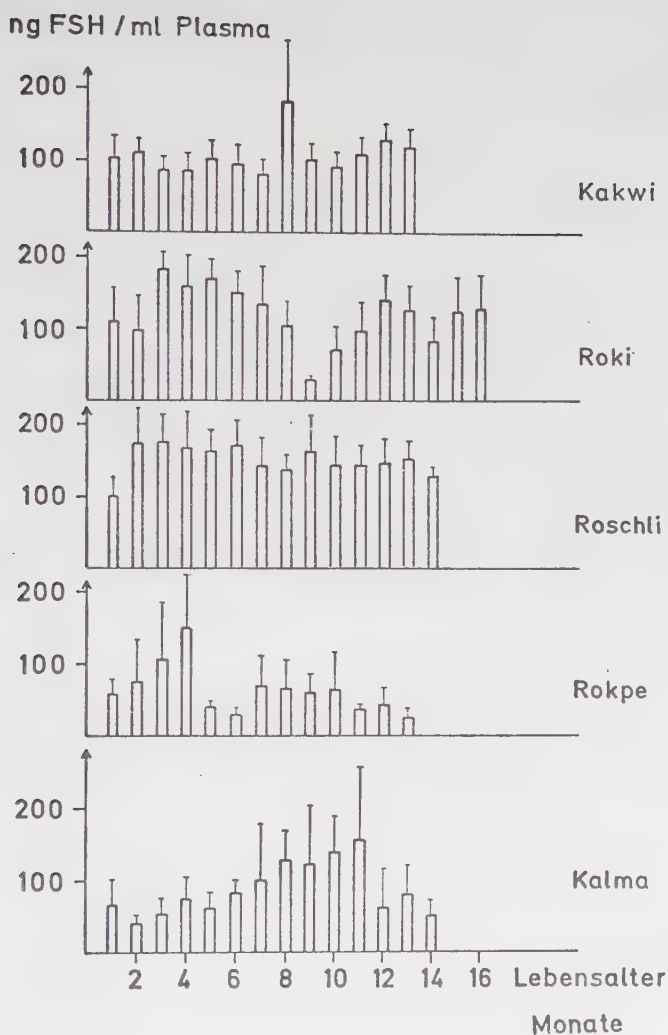


Abbildung 26:

Pubertätsversuch - Langzeitstudie: monatliche FSH-Mittelwerte
(mit positiver Standardabweichung) bei 5 Kalbinnen

Tiere mehr oder weniger deutliche wellenartige FSH-Spiegel mit höheren Standardabweichungen als bei den männlichen Tieren, wobei der wellenartige Verlauf am ausgeprägtesten bei den Tieren Roki, Rokpe und Kalma verfolgt werden kann.

3.6. Brunstzyklus

FSH-Werte während des Zyklus beim weiblichen Rind wurden an 15 Kühen und 8 Kalbinnen während 27 regelmäßiger Zyklen untersucht; die durchschnittliche Zykluslänge bei diesen Tieren betrug $21,2 \pm 1,8$ Tage, die Brunstdauer $16,9 \pm 4,9$ Stunden und das Intervall von Brunstbeginn zur Ovulation $32,1 \pm 7,9$ Stunden. Blutproben wurden mindestens in 6-stündigem Abstand gewonnen, bei einigen Tieren um die Zeit der Brunst und Ovulation auch häufiger; dabei wurden auch sichtbare Brunstsymptome beobachtet und gleichzeitig rektale Palpation des Uterus und der Ovarien durchgeführt. Der Tag der festgestellten Ovulation wurde als Tag 1 eines neuen Brunstzyklus bestimmt, alle Zeitangaben werden darauf bezogen.

Erster Brunstzyklus bei Kalbinnen:

Die FSH-Spiegel der 5 weiblichen Tiere, die schon seit der Geburt verfolgt werden konnten, wurden während des ersten regelmäßigen Zyklus in 6-stündigem Intervall gemessen. Bei "Roschli" wurden während der 32. und 33. Lebenswoche undeutliche Brunsterscheinungen ohne Follikelwachstum festgestellt, bei "Kalma" während der 43. Woche mit deutlicher Follikelanbildung, jedoch ohne Ovulation. Diesen Vorgängen konnten keine eindeutigen FSH-Veränderungen zugeordnet werden. Die erste Brunst mit deutlichen äußeren Symptomen und rektal festgestellter Ovulation trat während des Zeitraumes von der 41. ("Roschli"), 42. ("Rokpe"), 45. ("Kakwi"), 47 ("Kalma") bis 60. Woche ("Roki") auf. 4 Kalbinnen zeigten während dieser ersten Brunst mehr oder weniger ausgeprägte FSH-Erhöhen (Abbildung 27) mit Ausnahme von "Roschli", bei der die FSH-Spiegel während des sich anschließenden Zyklus relativ gering schwanken; eine deutliche Erhöhung ist am Tag 16 meßbar. Auch die

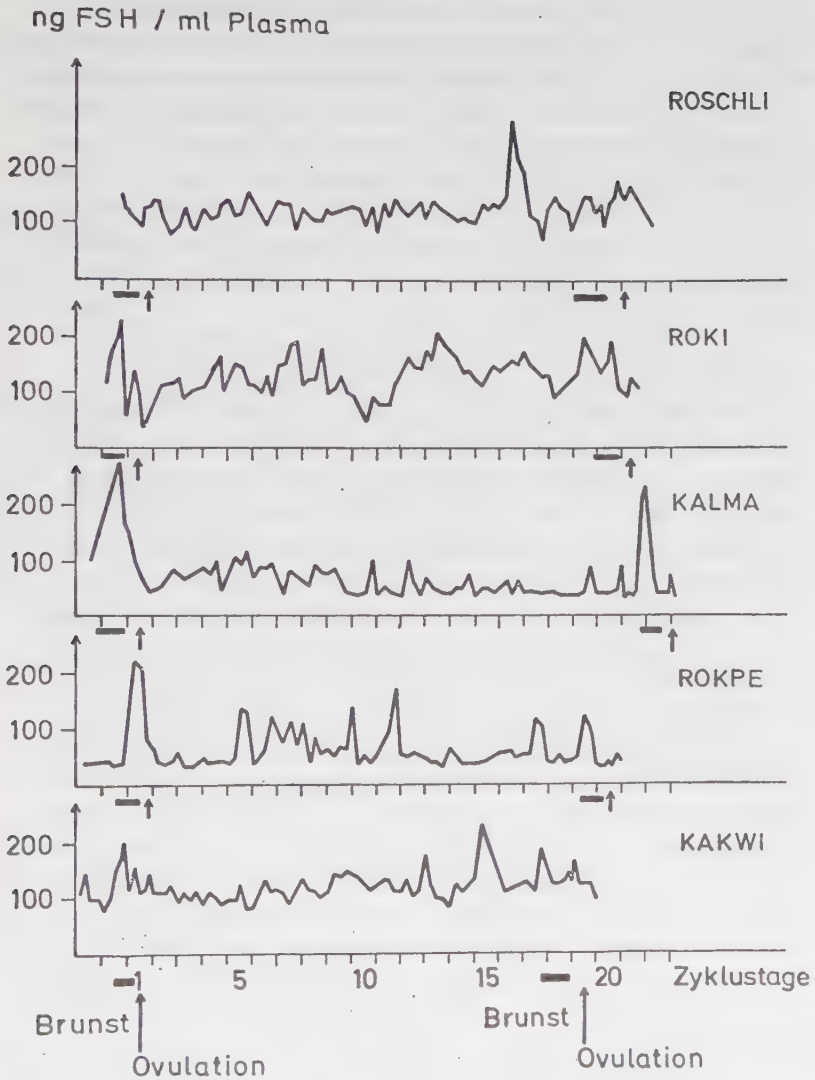


Abbildung 27:

FSH-Werte während des ersten regelmäßigen Brunstzyklus bei 5 Kalbinnen

Kalbinnen "Kalma" und "Kakwi" weisen nur kurzzeitige Schwankungen im Hormonprofil auf, während der 2. Brunst ist ein klarer präovulatorischer FSH-Peak nur bei "Kalma" meßbar. Niedrige Basalwerte und ausgeprägte Erhöhungen finden sich bei "Rokpe", hier ist eine erhöhte FSH-Aktivität in der Periode zwischen Tag 5 bis 11 und an den Tagen 17 und 19 des 20-tägigen Zyklus auffallend. Deutlich erniedrigte FSH-Werte hat "Roki" von Tag 9 - 11, während an den Tagen 7, 8, 12 - 14 und erneut einen Tag vor und während der Brunst etwas vermehrte FSH-Aktivität feststellbar ist. Die Zykluslänge aller Tiere ist noch nicht klar eingependelt, sie schwankt von 18 bis 22 Tagen.

Brunstzyklus bei Kühen:

Drei individuelle Beispiele mit 21-, 23- und 25-tägiger Zykluslänge sind in Abbildung 28 dargestellt; offensichtlich sind bei allen drei Tieren die starken individuellen Fluktuationen bei nicht konstanten Basiswerten. Etwa parallel zum präovulatorischen LH-Peak während der Brunst sind bei der Kuh "Roki" deutliche FSH-Erhebungen zu sehen, die aber von höheren und länger andauernden Gipfeln während der Tage 4 - 5, 17 und 19 überragt werden; daneben treten während der übrigen Zyklustage Schwankungen des Hormonspiegels bis zu 100 ng/ml auf; konstant niedrige FSH-Werte sind nur am Tag 1 nach der Ovulation zu sehen. Viel geringere Schwankungen zwischen 76 bis 202 ng/ml zeigt das Tier "Kakwi"; etwa parallel zum präovulatorischen LH-Peak treten hier nur geringfügige Erhöhungen der Blutwerte auf, jedoch sind ca. 24 Stunden andauernde höhere Werte an den Tagen 4 - 5, 11, 15 und 19 - 20 zu beobachten. Die Kuh "Adria" zeigt ebenfalls einen kaum ausgeprägten präovulatorischen FSH-Anstieg, dafür sind an den Tagen 7 - 9, 20, 21 und 23-24 deutliche FSH-Gipfel ersichtlich. Die FSH-Erhebungen bei allen 3 Tieren 4 - 5 Tage vor der Ovulation und bei den Kühen "Roki" (Tag 4 - 5) und "Adria" (7 - 9) sind signifikant ($p < 0,05$).

FSH-Zyklusschema:

Da aus keinem der Einzelzyklen ein einheitliches klares Bild über den "typischen" Verlauf der FSH-Werte gewonnen werden konnte, sondern nur mehr oder weniger deutlich auftretende Erhöhungen vermehrt an den

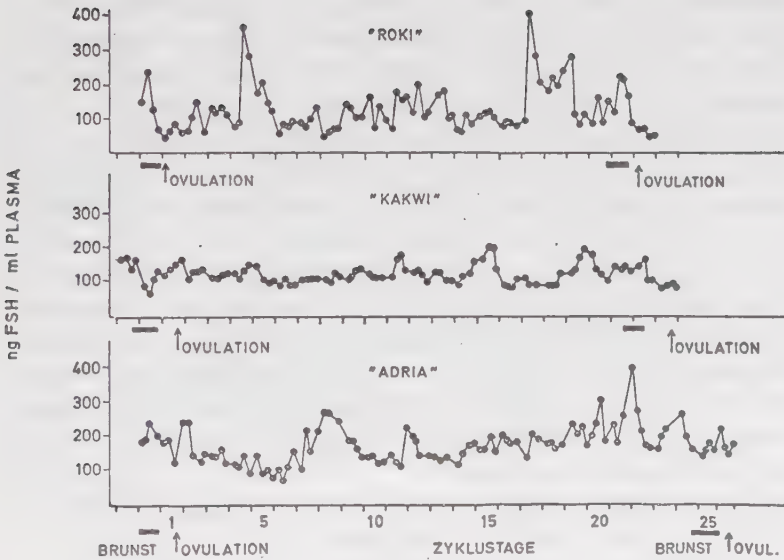


Abbildung 28:

FSH-Werte während des Zyklus von drei Kühen

Tagen 4 - 6, 10 - 12 und insbesondere 16 - 19 auffielen, wurde ein Modell zum Vergleich von Individualzyklen entwickelt, welches das unterschiedliche Niveau der Ausgangswerte berücksichtigend eine klare Abgrenzung von FSH-Kurzzeitschwankungen und längerdauernden Erhöhungen ermöglichen sollte. Gerade das sehr unterschiedliche Ausgangsniveau erlaubt sonst keine Zusammenfassung der gemessenen Konzentrationen.

In einem ersten Schritt wurden das arithmetische Mittel und die positiven und negativen Standardabweichungen für alle gemessenen Werte eines jeden Einzelzyklus errechnet; im zweiten Schritt wurden diejenigen Hormonkonzentrationen, welche innerhalb des vorher berechneten Bereichs $\bar{x}_1 \pm s_1$ lagen - wiederum getrennt für jeden Einzelzyklus - erneut gemittelt; dieser resultierende Ausdruck $\bar{x}_2 \pm s_2$ wurde als normale "Basalverteilung" des FSH-Spiegels während des Zyklus definiert. $\bar{x}_2$ wurde als 100 %-Mittelwert bestimmt; alle Einzelwerte der Individualzyklen, die außerhalb des errechneten Bereichs $\bar{x}_2 \pm s_2$ lagen, wurden für jeden individuellen Zyklus in Prozent dieses Mittelwerts ausgedrückt. Diese relativen Werte konnten schließlich zusammengefaßt werden, wobei eine "Ideal-Mittelwertkurve" für das Hormonprofil während des Zyklus gebildet wurde (siehe Abbildung 29); um die individuellen Zykluslängen vernachlässigen zu können, wurde als Fixpunkt die festgestellte Ovulation genommen und alle Werte mit entsprechendem zeitlichem Abstand vor und nach der Ovulation zusammengefaßt.

Die unterschiedlichen Zyklusmittelwerte aller 23 Einzeltiere (15 Kühe, 8 Kalbinnen) sind in Tabelle 9 ausgedrückt.

Beim Zyklusschema fällt ein wellenartiger Verlauf der FSH-Werte auf: signifikante "Peaks" ($p < 0,05$) treten in etwa viertägigem Abstand um den 4., 8., 12. - 13., 17. und 20. Tag auf; ein zusätzlicher "Peak" erscheint dazu noch am Tag 18. Die Gipfelpunkte weisen am 17. Tag 172 ± 94 % auf, am 18. Tag 163 ± 59 %, dazwischen liegt ein scharfer FSH-Einbruch mit abfallenden Werten bis 118 ± 37 %. Der FSH-Gipfel am Tag 20, der durchschnittlich 30 Stunden vor der Ovulation liegt, erreicht 185 ± 124 %; diese Erhebung während der Brunst ist im Gegensatz zu den jeweils nur 24 Stunden dauernden "Peaks" während des Zyklus über einen Zeitraum von 36 Stunden zu beobachten. Die niedrigsten FSH-Spiegel sind am 1., 6., 9. und 14. Zyklustag meßbar.

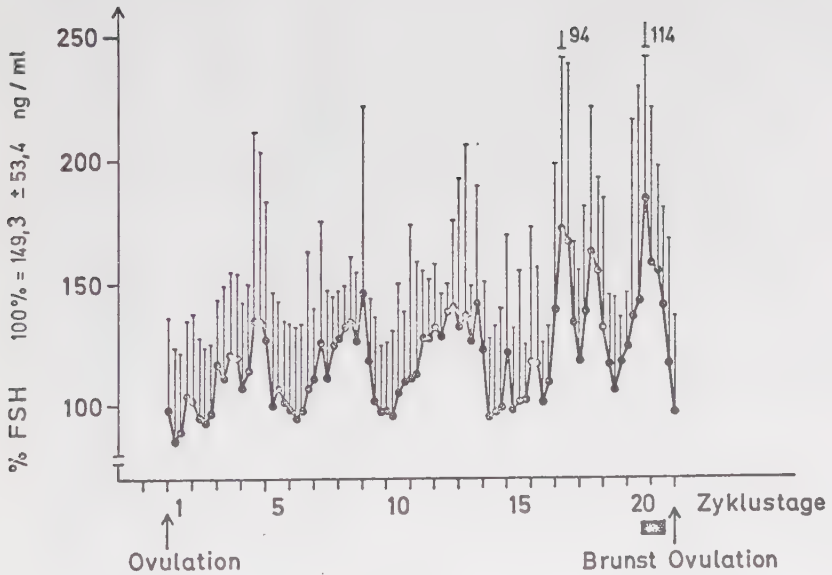


Abbildung 29:

FSH-Zykluschema beim Rind: Mittelwerte mit positiver Standardabweichung aus 27 regelmäßigen Zyklen von 23 Kühen und Kalbinnen
(Ordinate: % FSH, 100 % = 149,3 ± 53,4 ng NIH-FSH-B₄/ml Plasma)

Tabelle 9:

"Normale Basalverteilung" der FSH-Werte während des Zyklus

Tier		Anzahl unter- suchter Zyklen	100 % FSH = ng/ml		
			$\bar{x}_2$	$\pm$	s_2
Kuh	Adria	1	170,6		27,7
	Roschli	1	155,9		16,5
	Roki	1	106,1		36,4
	Kakwi	1	122,1		14,3
	Kalidel	1	91,8		13,0
	Thaiga	2	186,0		13,9
	Berta	1	245,5		13,7
	Evi	1	197,4		35,3
	Dora	1	91,8		23,4
	Fanni	1	169,7		15,1
	Gabi	1	110,4		24,8
	Helga	1	191,8		31,5
	Irma	2	227,7		25,3
	Joli	2	199,1		30,7
	Kati	2	223,4		32,2
Kalbin	Kalma	1	57,1		26,4
	Rokpe	1	45,5		13,7
	Kakwi	1	113,4		11,9
	Roschli	1	121,7		15,3
	Roki	1	124,2		21,6
	7278991	1	161,9		18,6
	726659	1	160,2		19,5
	7266571	1	160,6		23,8

Zusammenfassung:

Kühe	15	19	165,9	50,9
Kalbinnen	8	8	118,1	45,6
gesamt	23	27	149,3	53,4

3.7. Trächtigkeit, Geburt, post-partum-Periode

Trächtigkeit

An 4 Kühen wurden Langzeituntersuchungen zur Ermittlung des Profils an gonadotropen Hormonen während der Trächtigkeit durchgeführt; Blut wurde 3 - 4 mal täglich durch Punktion der V. jugularis gewonnen.

Bei den Tieren "Bruni" und "Adria" wurden anschließend an die künstliche Besamung ca. 2 Monate lang Blutproben gewonnen, danach wiederum ab dem 240. Trächtigkeitstag bis zum 10. bzw. 16. Tag post partum. Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, verlaufen die täglichen FSH-Mittelwerte bei beiden Tieren während der ersten beiden Trächtigkeitsmonate in wellenförmigen Bewegungen unterschiedlichen Niveaus. Beim Tier "Bruni" pendeln die Werte relativ eng etwa um den Wert 100 ng/ml, wohingegen beim Tier "Adria" zwei vollständige Wellen von 18 Tagen Dauer auffallen, bei denen die FSH-Konzentrationen im peripheren Plasma von ca. 100 ng/ml kontinuierlich auf ca. 200 ng/ml ansteigen, um danach wieder auf Basisniveau abzufallen. Vergleicht man bei diesem Tier die Individualwerte während des der Besamung vorausgegangenen 25-tägigen Zyklus mit den ersten 25 Graviditätstagen, (Abbildung 31), so fallen einige Gemeinsamkeiten auf: vom 10. - 19. Tag bestehen während Zyklus und Trächtigkeit relativ konstante Werte mit leicht ansteigender Grundtendenz, am 20., 21./22., 23./24. und 25. Tag treten in beiden Fällen Erhöhungen auf, die aber während der Gravidität gerade am 24. und 25. Tag nicht mehr so deutlich ausgeprägt sind.

Beide Kühe weisen gegen Ende der Gravidität ein wesentlich niedrigeres FSH-Niveau auf; beim Tier "Adria" erscheint wieder ein wellenförmiger FSH-Verlauf mit 14-tägigem Rhythmus. Bei beiden Tieren zeigen sich durch Flumethason-Injektionen am 260. bzw. 273. und 279. Tag zur Geburtsinduktion keine nachhaltigen Beeinflussungen der FSH-Charakteristik, auch die Geburt übt keinen Einfluß auf die Follikotropin-Werte aus.

Bei den Kühen "Atlante" und "Pola" wurden ebenfalls 3 - 4 mal täglich vom 220. bzw. 206. Trächtigkeitstag bis zum 41. bzw. 30. Tag post

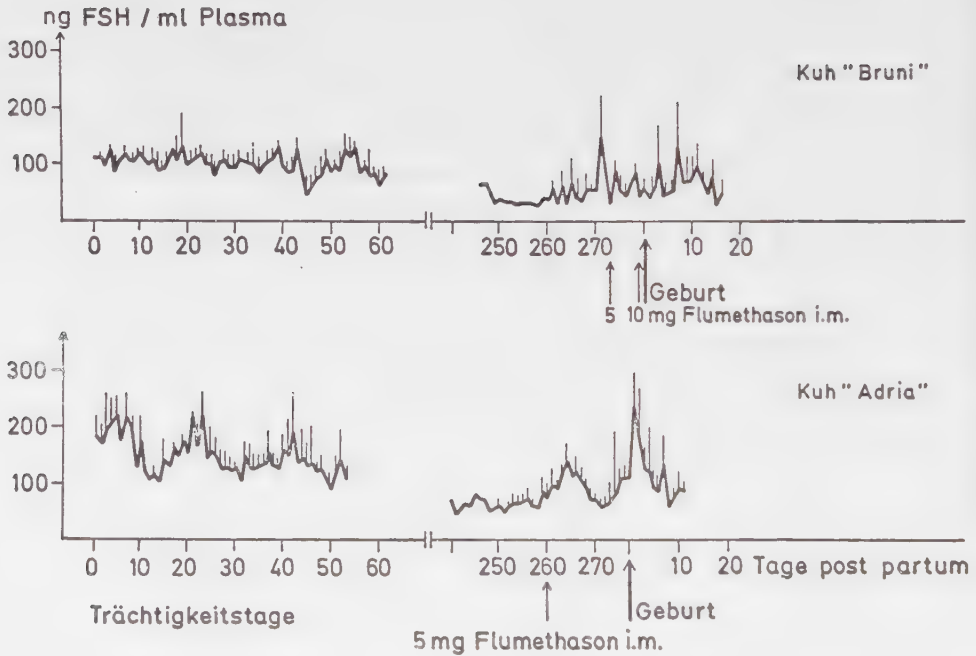


Abbildung 30:

FSH-Werte bei 2 Kühen während Trächtigkeit, Geburt und post-partum-Phase (tägliche Mittelwerte mit positiver Standardabweichung aus 3 - 4 Blutentnahmen in 6 - 8 stündigem Intervall)

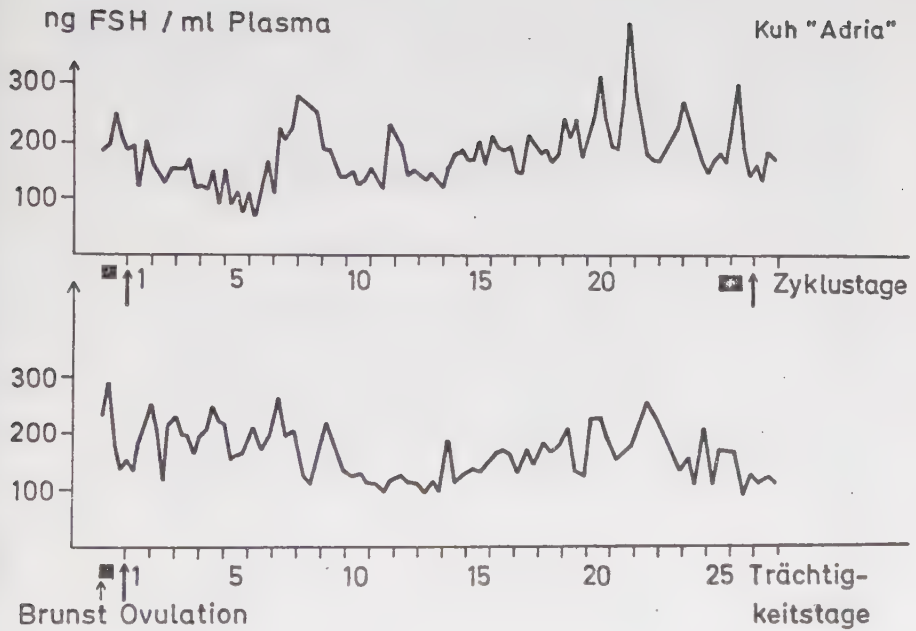


Abbildung 31:

Vergleich der FSH-Werte während eines 25-tägigen Zyklus und während der ersten 25 folgenden Graviditätstage bei einer Kuh

partum Hormonwerte aus dem peripheren Blut ermittelt. In Abbildung 32 sind die Tagesmittel mit positiver Standardabweichung eingezeichnet. Das Tier "Alante" weist ähnlich dem vorher besprochenen Tier "Adria" einen wellenförmigen Verlauf der FSH-Spiegel auf: jeweils etwa 13 - 17 Tage andauernde Perioden niedriger bis mittlerer und ansteigender bis hoher FSH-Werte können unterschieden werden. Auch hier zeigt die Geburt keine Beeinflussung ablaufender FSH-Bewegungen. Beim Tier "Pola" kann ebenfalls eine Tendenz länger andauernder Abläufe im Follikotropin-Spiegel gesehen werden: vom 206. bis 230. Tag liegen die Werte mit einer Ausnahme unter 100 ng/ml, vom 231. Tag bis zum 253. Tag mit einer Ausnahme über 100 ng/ml. Von der Geburt am 274. Tag bis zum 30. Tag post partum treten stärkere FSH-Schwankungen auf, danach erhöht sich das Basis-Niveau.

Geburt

Bei 8 Tieren konnten FSH-Bestimmungen während der Periode von 10 Tagen ante bis 10 Tagen post partum durchgeführt werden, 2 Tiere erfuhren eine Geburtsinduktion durch Glukocorticoide. Blutproben wurden 3 - 4 mal täglich durch Venenpunktion gewonnen. Fünf Einzelbeispiele des FSH-Verlaufs sind in Abbildung 33 dargestellt. Bei keinem Tier kann eine meßbare Beeinflussung durch den Geburtsablauf festgestellt werden.

Post-partum-Phase

Neben den schon erwähnten Tieren "Pola" und "Alante", bei denen kein Wiederingangkommen zyklischen Geschehens post partum beobachtet werden konnte, zeigten die Tiere "Zilla" und "Thaiga", die bis zum 67. bzw. 74 Tag p.p. verfolgt werden konnten, Brunsterscheinungen bereits 3 - 4 Tage nach der Geburt. Beide Tiere weisen einen außerordentlich gleichförmigen FSH-Verlauf auf, bei beiden Tieren wird 10 Tage nach der Geburt ein erhöhtes Hormonniveau erreicht (siehe Abbildung 34), welches während der nachfolgenden 57 bzw. 64 Tage annähernd beibehalten wird; bei der Kuh "Thaiga" erfolgt dieser FSH-Anstieg vom Tag 1 bis 10 p.p. gleichförmig, wohingegen die Kuh "Zilla" vom Tag 8 bis zum Tag 10 einen rapiden Anstieg der Werte

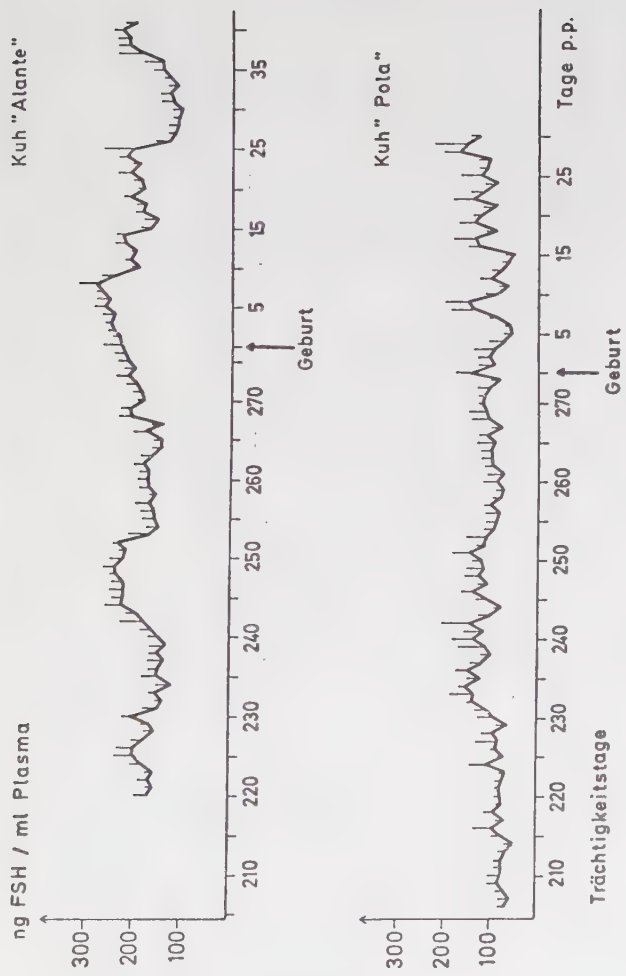


Abbildung 32:

FSH-Werte bei 2 Kühen während Trächtigkeit, Geburt und post-partum-Phase (tägliche Mittelwerte mit positiver Standardabweichung aus 3 - 4 Blutentnahmen in 6 - 8-stündigem Intervall)

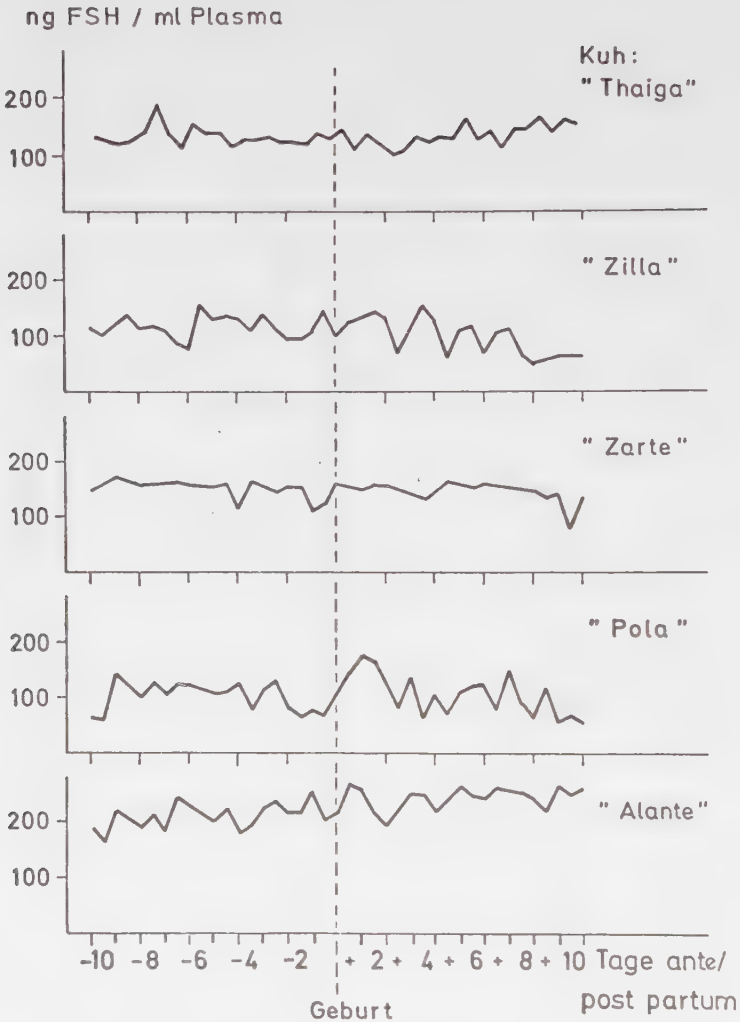


Abbildung 33:

FSH-Werte bei 5 Kühen während der Geburtsperiode (10 Tage ante bis 10 Tage post partum)

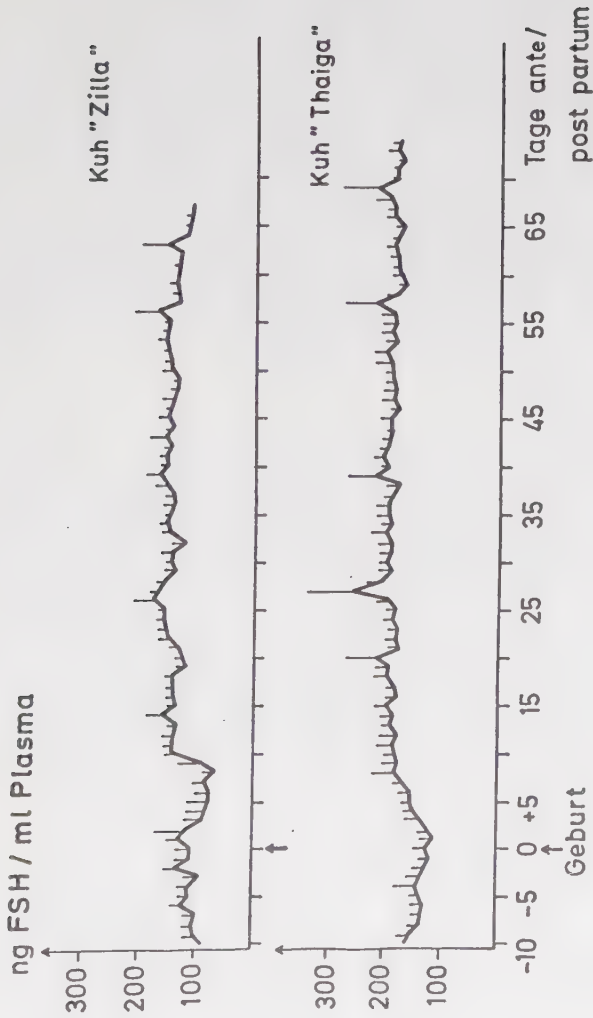


Abbildung 34:

Post-partum-Periode bei 2 Kühen (tägliche FSH-Mittelwerte mit positiver Standardabweichung aus 4 Blutentnahmen in 6-stündigem Intervall)

zeigt. Die Brunstsymptome bei diesem Tier an den Tagen 3 - 4 p. p. sowie eine Follikelanbildung an den Tagen 25, 37 und 42 lassen sich nicht mit Veränderungen im FSH-Verlauf in Beziehung bringen, ebenso nicht die ausgeprägten Brunsterscheinungen zwischen Tag 43 und 46; die Uterusinvolution ist bei diesem Tier am Tag 28 abgeschlossen, bei der Kuh "Thaiga" am Tag 31; diese Kuh zeigt Brunstsymptome an den Tagen 4, 22/23, 43/44 und 64, also annähernd in regelmäßigem 20-tägigen Abstand; nach der Brunst am Tag 23 konnte keine Ovulation palpiert werden, jedoch wurden Ovulationen an den Tagen 44 und 64 registriert; die nur gering ausgeprägten 24-stündigen FSH-Erhebungen während der Tage 20, 27, 39, 57 und 69 können damit nicht in Zusammenhang gebracht werden.

3.8. Futterentzug bei 2 weiblichen Tieren

Dieser Versuch wurde an 2 Tieren während der Hochlaktation post partum durchgeführt; Blutproben wurden in zweistündigem Intervall durch Punktion der V. jugularis gewonnen; nach 1 1/2 Tagen Kontrollperiode mit Weidegang bei normaler Fütterung wurde den Tieren - bei gleichbleibender Haltung - Maulkörbe angelegt, wodurch die Futteraufnahme unterbunden, die Wasseraufnahme aber unbeeinflusst blieb; diese 48 stündige Fastenperiode wird am 5. Versuchstag durch viermalige jeweils auf 15 Minuten begrenzte Heu- und Grünfutteraufnahme abgelöst. Verschiedene Stoffwechselparameter wurden bestimmt, die vom Futterentzug während des Versuchs beeinflusst wurden (siehe Schams und Karg 1970). Die FSH-Werte (siehe Abbildung 35) zeigen bei beiden Tieren während der ersten beiden Versuchstage episodische Schwankungen von 200 bis 280 ng/ml; die Schwankungen sind am ersten Tag des Futterentzugs bei der Kuh "Adria" stärker ausgeprägt, während des 4. Tages sinken dann die FSH-Werte stark ab, um kontinuierlich im Verlauf des letzten Versuchstags wieder anzusteigen. Beim Tier "Bruni" zeigt sich mit Beginn des Futterentzugs eine Tendenz abfallender FSH-Spiegel, am 4. Tag steigen sie zwar etwas an, verharren aber während des folgenden Tages mit einer Ausnahme auf einem Niveau, das deutlich niedriger liegt

ng FSH / ml Plasma

Adria

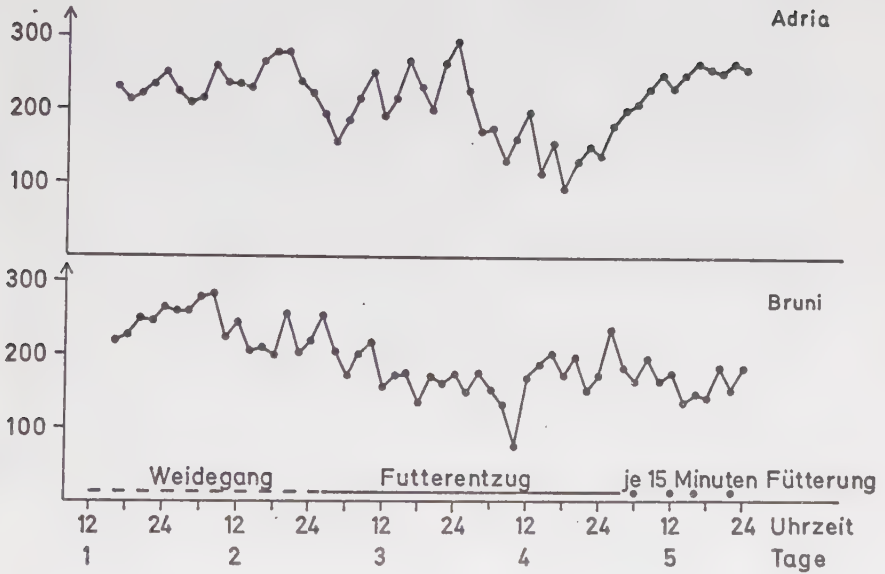


Abbildung 35:

FSH-Spiegel von 2 Kühen während eines Versuches mit 48-stündigem Futterentzug

als während der Kontrollperiode, in der solch niedrige Werte kein einziges Mal auftraten.

3.9. Kastration bei einem männlichen Kalb

Ein Kalb wurde im Alter von 4 Wochen kastriert. Einen Tag vor dem Eingriff wurde 8 Stunden lang in 15-minütigem Intervall via Dauerkatheter Blut gewonnen. Das Kalb zeigte neben geringfügigen Schwankungen zwei deutlicher ausgeprägte 15 - 30 Minuten dauernde FSH-Erhöhungen (siehe Abbildung 36), der Mittelwert aller gewonnenen Proben lag bei 87 ± 27 ng/ml. Drei Wochen später wurde die Blutentnahme wiederholt; jetzt ergab sich ein hochsignifikant nach oben verschobener Mittelwert ($2p < 0,001$) von 158 ± 25 ng/ml. Annähernd parallel zu den 3 Wochen zuvor aufgetretenen Fluktuationen traten erneut FSH-Erhöhungen mit ähnlicher Schwankungsbreite auf.

3.10. Einfluß von Steroidhormonen

In 4 Versuchsserien mit 8 bzw. 30 Stunden Dauer wurden männlichen und weiblichen Rindern Östradiol-17 β oder Progesteron infundiert; peripheres Blut wurde mit Jugularisdauerkathetern in 15-bis 30-minütigem Abstand gewonnen.

Kontrollversuch:

Nach Infusion von je 500 ml phys. Kochsalzlösung mit 10 Volumenprozent Alkohol (dem Infusionsvehikel von Östradiol und Progesteron) bei 2 Jungbullen konnten keinerlei versuchsbedingte Veränderungen der FSH-Plasma-Werte gefunden werden.

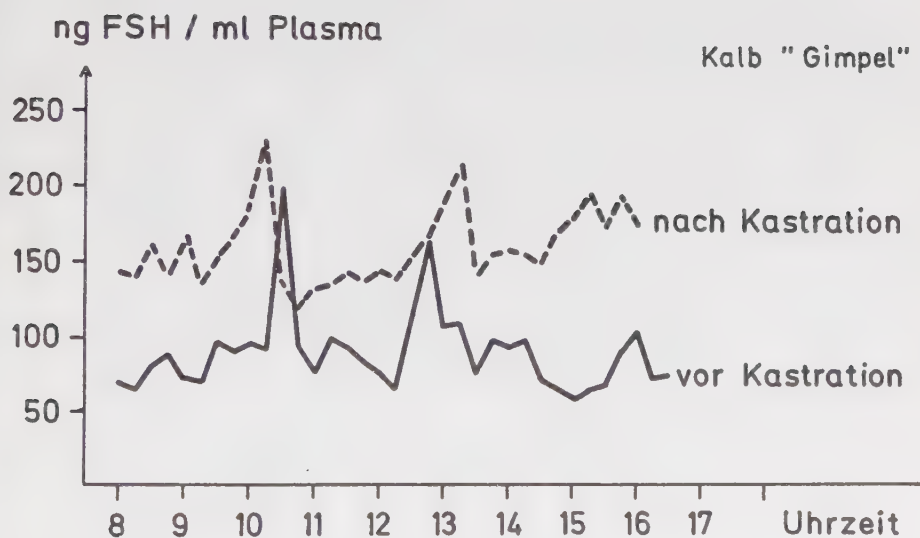


Abbildung 36:

Beeinflufung der FSH-Werte bei einem Kalb durch Kastration

(FSH-Tagesprofile einen Tag vor und 3 Wochen nach Kastration)

Östradiol-17 β -Infusionen:

In einer Serie wurden 3 Jungbullen steigende Dosierungen von 0,5, 1,0 und 2,0 mg Östradiol-17 β , gelöst in 500 ml 10 % alkoholischer NaCl-Lösung 1 Stunde lang infundiert. Bei allen 3 Dosierungen veränderten sich die FSH-Spiegel während der Infusion signifikant gegenüber der vorhergehenden einstündigen Kontrollperiode (siehe Tabelle 10).

Bei der niedrigsten Östradiol-17 β Dosis (0,5 mg) steigen die FSH-Werte bei beiden Tieren hochsignifikant während der Infusion an, um anschließend etwa wiederum auf das Niveau der Kontrollwerte abzufallen. Dagegen erniedrigen sich die Werte bei Dosierungen von 1,0 und 2,0 mg während der Infusion signifikant, jeweils binnen 30 Minuten nach Absetzen der Infusion steigen sie wieder auf Ausgangsniveau.

In einer zweiten Serie wurden 2 Kalbinnen 5,0 mg Östradiol-17 β gelöst in 1500 ml 10 % alkohol. NaCl-Lösung jeweils 4 Stunden lang nach einer vorausgehenden Kontrollperiode von 4 Stunden durch Dauerkatheter in die V. jugularis infundiert, was einer Dosis von 1,25 mg/Stunde in 375 ml entspricht; mit Hilfe eines Dauerkatheters in der gegenüberliegenden Jugularvene wurden 30 Stunden lang Proben gezogen, in der 12 stündigen Intensivperiode (1 Stunde vor bis 7 Stunden nach Infusionsbeginn) in 15-minütigem Intervall, ansonsten in 30-minütigem Abstand (siehe Abbildung 37).

Mit Infusionsbeginn fallen bei beiden Tieren die FSH-Werte innerhalb 1 Stunde auf etwa die Hälfte des jeweiligen Ausgangswertes ab, um etwa 1 Stunde nach Infusionsende wieder anzusteigen. Der Mittelwert der jeweiligen Kontrollproben ($167,8 \pm 27,6$ bzw. $141,2 \pm 40,9$ ng/ml NIH-FSH- B_1) ist gegenüber demjenigen während der Infusion ($82,2 \pm 27,8$ bzw. $76,0 \pm 17,6$ ng/ml) bei beiden Kalbinnen hochsignifikant unterschieden ($2p < 0,001$). Die FSH-Konzentrationen bei Kalbin 7363594, die sich während des Versuchs im Proöstrus und Östrus befand, wie die Progesteronwerte vor, während und nach dem Versuch bestätigten (0,1, 0,2 und 0,2 ng/ml), steigen nach Absetzen der Infusion konstant an, um 12,5 Stunden nach Infusionsbeginn ihr Maximum zu erreichen und danach wieder abzufallen; diese FSH-Gipfelwerte fallen nahezu mit einem präovulatorischen LH-Peak zusammen.

Die FSH-Konzentrationen bei Kalbin 7364596 steigen nach Infusionsende wieder auf Ausgangsniveau an; dieses Tier war im Diöstrus, was

Tabelle 10:

Veränderung der FSH-Spiegel bei Jungbullen durch Östrogen-Infusion

Infusion Östradiol-17 B mg	Tier	Kontrollperiode (1 h)			Infusionsperiode (1 h)			Signifikanz
		n	$\bar{x}$	$\pm s$	n	$\bar{x}$	$\pm s$	
			ng NIH-FSH-B ₁ /ml			ng NIH-FSH-B ₁ /ml		
0,5	Kaliro	4	192,7	4,4	5	234,2	18,4	p < 0,005
	Kabine	4	172,7	16,6	5	239,0	6,1	p < 0,0005
1,0	Kaliro	3	204,0	27,5	5	162,4	12,4	p < 0,05
2,0	Kabine	3	247,6	38,0	5	185,2	40,4	p < 0,05
	Lado	4	296,3	13,0	5	260,2	6,1	p < 0,005

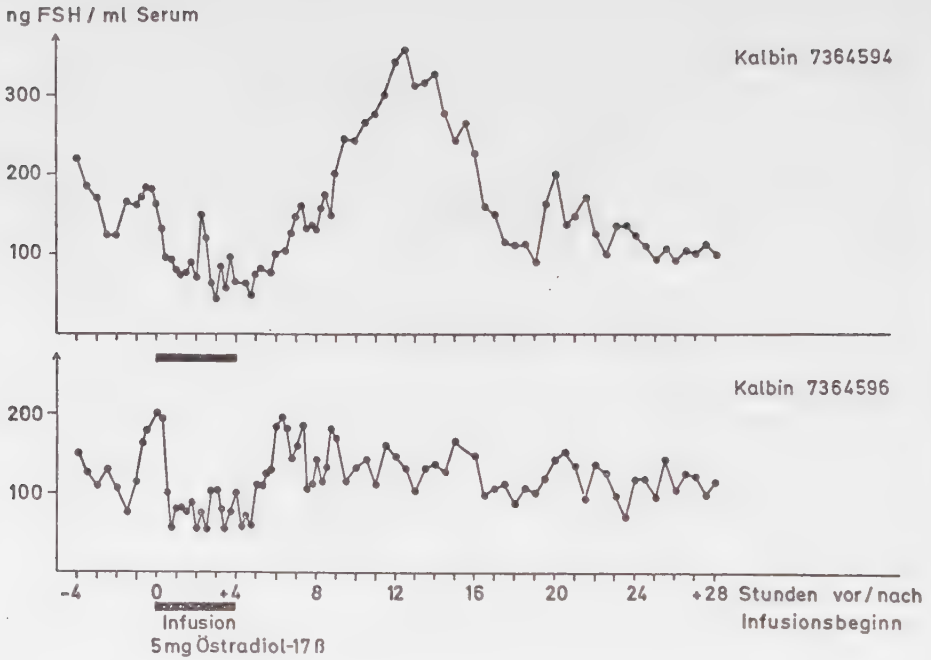


Abbildung 37:

Beeinflussung der FSH-Sekretion durch Östrogen-Infusionen bei 2 Kalbinnen (5 mg Östradiol-17 B/4 Stunden i.v.)

Progesteronwerte von 1,6, 1,8 bzw. 4,0 ng/ml unterstreichen.

Progesteron-Infusionen:

In einer Versuchsserie an Bullen (analog der eben beschriebenen ersten Serie) wurden Dosierungen von 5, 10, 40 und 80 mg Progesteron ebenfalls eine Stunde lang infundiert; es konnte keine der Infusion zuzuordnende Veränderung der FSH-Spiegel beobachtet werden.

3.11. Versuche mit Gonadoliberin (GnRH) und einem Gonadoliberin-Analog

Das synthetische Releasinghormon GnRH (Hoe 471) bekamen wir von den Farbwerken Hoechst AG, Frankfurt/Main, zur Verfügung gestellt. Die lyophilisierte Substanz wurde vor der Injektion in 0,9 % NaCl gelöst. Um die Freisetzung gonadotroper Hormone nach Verabreichung von Gonadoliberin zu überprüfen, wurden abgestufte Dosierungen von 15 bis 3000 µg GnRH intravenös bzw. intramuskulär an 13 Kühe, 14 Kalbinnen, 2 Bullen und 7 männliche und weibliche Kälber verabreicht. Blutentnahmen erfolgten mit Hilfe eingelegter Dauerkatheter aus der Vena jugularis. Nach einer mindestens 30-minütigen Kontrollperiode mit 2 - 3 Blutentnahmen für Basalwerte erfolgte die Injektion des Releasinghormons. Anschließend wurden Plasma-proben während einer mindestens 2-stündigen Intensivperiode in 5 bis 15-minütigem Intervall gewonnen, daran schloß sich ein Zeitraum von Entnahmen in 1/2 bis 1-stündigem Abstand an, nach 7 bis 9 Stunden wurden die Intensivversuche beendet.

Wiederholte intravenöse Injektionen bei steigender Dosierung:

An 1 Bullen, 1 Kalbin und 3 Kühen wurden Versuche mit drei- bis vier-stündigem Injektionsintervall durchgeführt; 3 Tieren wurde jeweils die doppelte Dosis nachinjiziert (50/100/200 µg oder 500/1000/2000 µg), 2 Tiere erhielten jeweils die Dosierungsstufen 300/600/900 µg GnRH). Als Beispiele sind in Abbildung 38 die FSH-Werte bei der

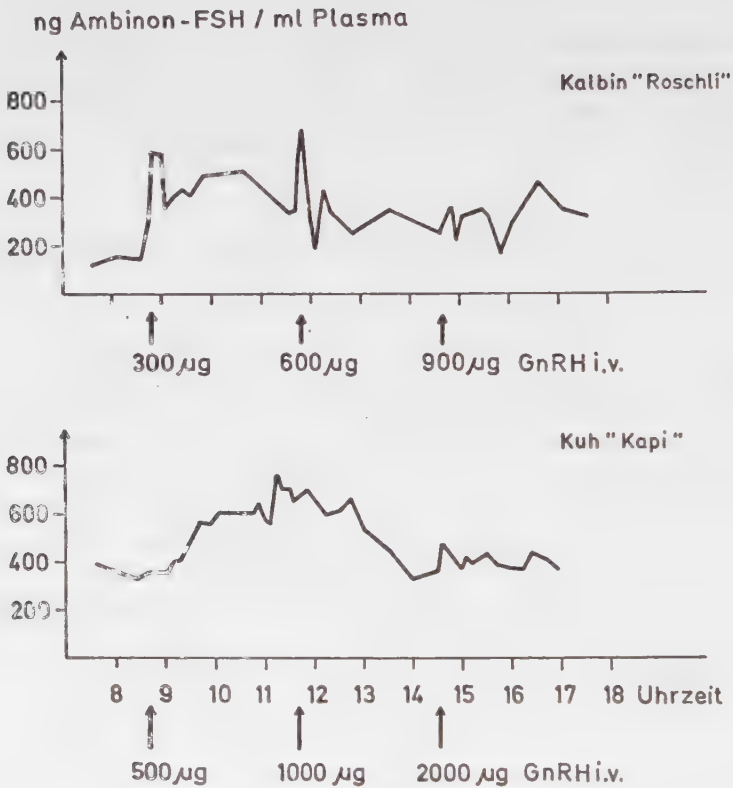


Abbildung 38:

FSH-Freisetzung nach wiederholten intravenösen Injektionen von GnRH bei 2 weiblichen Rindern (Kalbin "Roschli" 3. Zyklustag, Kuh "Kapi" 13. Zyklustag)

(Ambinon-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

Kalbin "Roschli" und bei der Kuh "Kapi" dargestellt. In beiden Fällen konnte mit der 2. Injektion eine zusätzliche FSH-Freisetzung provoziert werden, die beim Tier "Kapi" in die noch andauernde Anstiegsphase der 1. Injektion fiel; mit der 3. Injektion wiederum 3 oder 4 Stunden später konnte weder mit der Dosis von 900 noch mit 2000 μg GnRH eine über eventuelle episodische Schwankungen hinausreichende Follitropin-Freisetzung bewirkt werden.

Dosis-Wirkungsbeziehungen nach intravenöser Injektion:

Eine Zusammenfassung von 21 Experimenten an Kalbinnen und Kühen mit intravenösen Injektionen von 50, 250, 300, 500, 600, 1000 und 1500 μg GnRH ist in Tabelle 11 dargestellt; die beste FSH-Freisetzung ist im Bereich von 250 - 300 μg meßbar.

FSH-Freisetzung nach intramuskulärer Injektion

Dosisabhängigkeit bei einem weiblichen und männlichen Tier:

In Abbildung 39 sind typische Individualkurven dosisabhängiger FSH-Freisetzung zu sehen. Das weibliche Tier "Bruni" wurde mit Dosierungen von 62,5, 500 und 1500 μg GnRH jeweils am 12. Zyklustag behandelt, das männliche Tier "Kabine" mit Dosierungen von 62,5, 250, 500 und 1500 μg ; auf die beiden niedrigeren GnRH-Konzentrationen reagiert der Bulle besser als die Kuh, mit den höheren Dosierungen läßt sich bei diesem Tier die FSH-Freisetzung nicht mehr nachhaltig weiter steigern. Beim Tier "Bruni" fallen die stark unterschiedlichen Basalwerte auf, die bei dem Experiment mit 1500 μg über 400 ng/ml höher liegen als bei den übrigen Versuchen, trotzdem werden mit der hohen Dosis die Maximalwerte des Experiments mit 500 μg kaum überschritten. Bei beiden Tieren fällt ein stark pulsatiler Verlauf der FSH-Freisetzung auf.

Wiederholte Injektionen in 24 Stunden Abstand:

Diese Experimente wurden bei einem Bullen, 2 Kalbinnen und einer Kuh mit Dosierungen von 250 oder 1500 μg GnRH durchgeführt. 2 weibliche Tiere (Abbildung 40) wurden in eintägigem Intervall von Tag 12 - 14 des Zyklus injiziert, insgesamt wurde nach jeder Behandlung mit Ausnahme der 3. bei Kuh "Laro" annähernd die gleiche FSH-Menge freigesetzt.

Tabelle 11:

Zusammenfassung der Versuche mit intravenöser Injektion von Gonadoliberin

(Standard Ambionon-FSH: 50, 300, 500 µg; Standard NIH-FSH-B₁: 250, 600, 1000, 1500 µg)

Dosierung GnRH (µg)	Anzahl Versuche (n)	Basalwert (ng/ml)		Gipfelwert (ng/ml)		Endwert (ng/ml)		Zeit bis Peak (Min)		Zeitdauer erhöhter Werte (Min)		Quotient Gipfel-/Basalwert	
		$\bar{x}$	$\pm$ s	$\bar{x}$	$\pm$ s	$\bar{x}$	$\pm$ s	$\bar{x}$	$\pm$ s	$\bar{x}$	$\pm$ s	$\bar{x}$	$\pm$ s
50	1	750	35	966		723	12	15		-		1,3	
250	13	124	24	222	64	129	24	46	27	128	52	1,8	0,6
300	2	249	39	679	136	-		33	18	-		2,7	1,8
500	2	300	81	516	132	267	26	53	32	120	0	1,7	0
600	1	76	23	114		90	4	30		40		1,5	
1000	1	128	37	257		114	34	60		120		2,0	
1500	1	43	3	106		49	6	95		180		2,4	

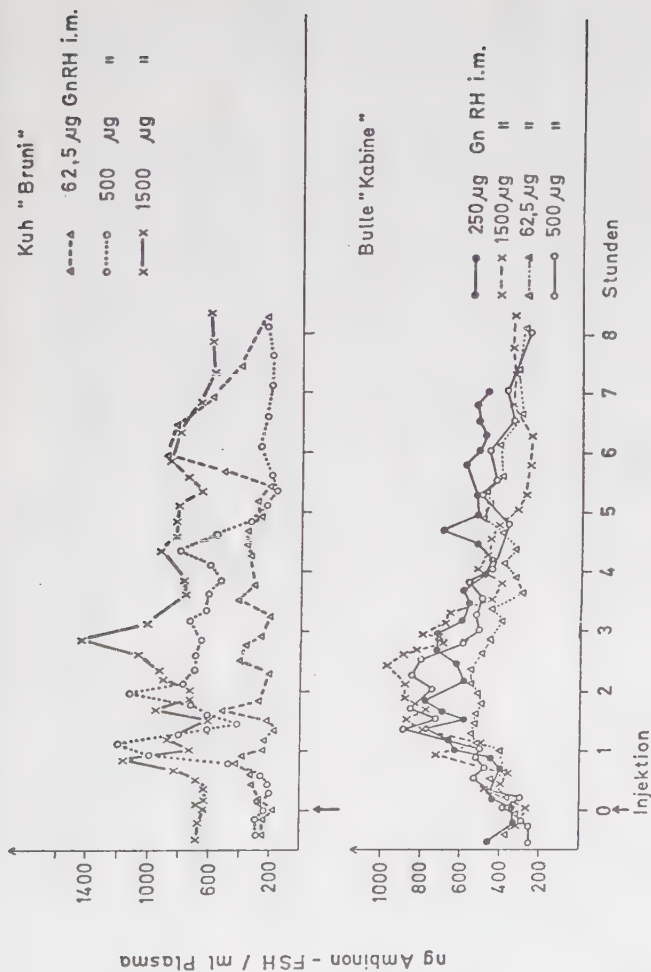


Abbildung 39:

Dosisabhängigkeit der FSH-Freisetzung bei einem weiblichen und einem männlichen Rind nach intramuskulären Injektionen von 62,5; 250; 500 und 1500 μ g GnRH)
 (Ambion-FSH = 0,33 x NIH-FSH-B₁)

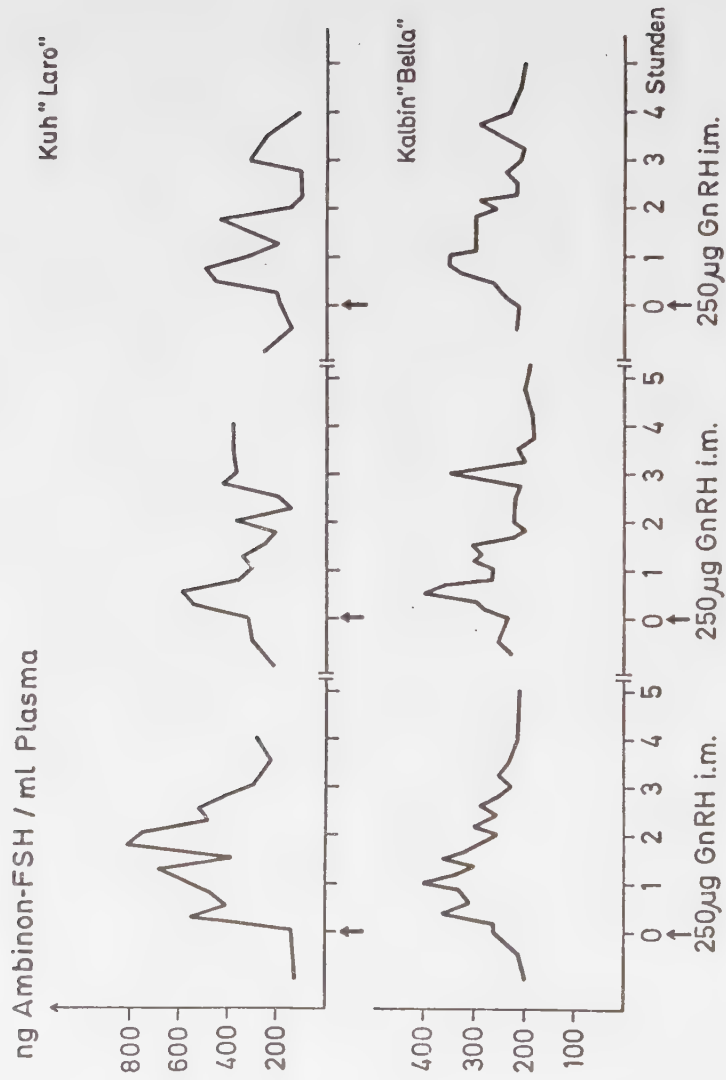


Abbildung 40:

FSH-Freisetzung nach wiederholten intramuskulären Injektionen von 250 µg GnRH in 24-stündigem Abstand bei einer Kuh und einer Kalbin (Tag 12, 13 und 14 des Zyklus)
 (Ambinon-FSH = 0,33 x NIH-FSH-B₁)

Dem Bullen "Kaliro" wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen 1500 μ g GnRH injiziert (Abbildung 41). Nachdem am ersten Behandlungstag nach 7 Stunden die Ausgangswerte noch nicht wieder erreicht werden konnten und am 2. Tag die Reaktion insgesamt etwas vermindert war, wurde am letzten Versuchstag eine dem ersten Tag vergleichbare Reaktion beobachtet.

Dosis-Wirkungsbeziehungen nach intramuskulärer Injektion von GnRH: Diese Experimente wurden mit erwachsenen Bullen und Kühen bzw. Kalbinnen während der Lutealphase des Zyklus (Tag 5 - 18) durchgeführt. Werden alle 39 Versuche mit den Dosierungen von 15, 62,5, 250, 500, 1000, 1500 und 3000 μ g GnRH zusammengefaßt (siehe Tabelle 12), so ergibt sich bei 500 μ g ein Maximum der FSH-Erhöhung ($2p < 0,01$), mit 1500 μ g beträgt sie nur 62,5 %, mit 250 μ g immerhin schon knapp 55 %. Wenn diese Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen intramuskulär verabreichter Releasinghormon-Menge und dem Faktor der FSH-Erhöhung, der Zeitdauer bis Erreichen des FSH-Gipfelpunktes bzw. der Dauer erhöhter FSH-Werte graphisch dargestellt werden (Abbildung 42), läßt sich in allen 3 Fällen eine Wirkungssteigerung bis zu einer Dosis von 500 μ g ersehen, mit einer höheren Dosierung bleibt die Wirkung zwar nahezu gleich lang erhalten, jedoch fällt der Faktor der FSH-Erhöhung bereits wieder ab.

Zyklusabhängigkeit der Freisetzung:

Vier regelmäßig zyklischen Kalbinnen wurde an den Tagen 4/5, 11/12 und 17/18 jeweils 250 μ g GnRH i. v. verabreicht. Die Mittelwerte aller Versuche (mit den positiven Standardabweichungen) während der verschiedenen Zyklastage sind in Abbildung 43 zusammengefaßt. Die Fläche unter der Kurve, die aus den Mittelwerten gebildet wurde, umschließt an den Tagen 4/5 26 Flächeneinheiten, an den Tagen 11/12 28 Flächeneinheiten und an den Tagen 17/18 31 Flächeneinheiten, zeigt also deutlich ansteigende Tendenz.

Zwei Kühen wurden an den Zyklastagen 5, 11/12 und 18 jeweils 62,5 bzw. 500 μ g GnRH i. m. gespritzt; mit der niedrigen Dosis von 62,5 μ g wurde am Tag 18 signifikant ($p < 0,05$) mehr FSH freigesetzt als während der

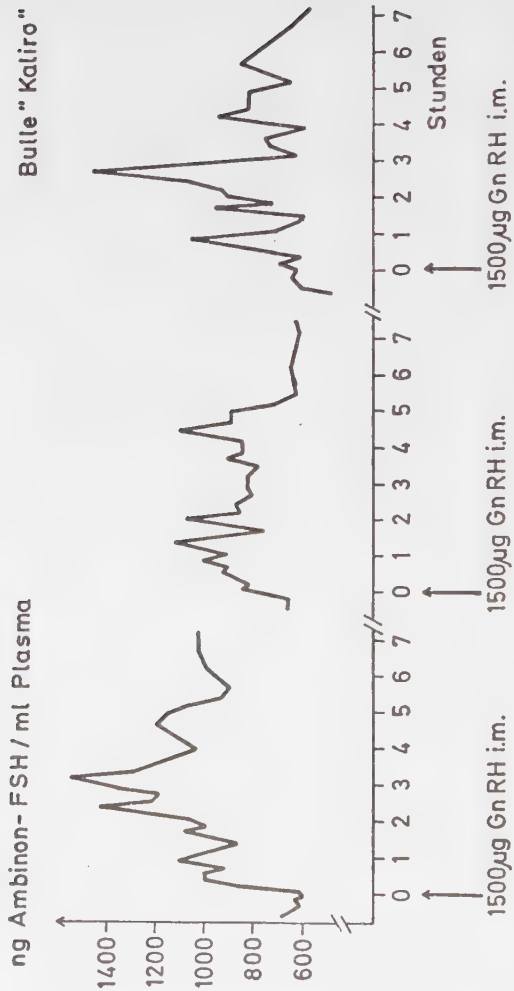


Abbildung 4:

FSH-Freisetzung nach wiederholten intramuskulären Injektionen von 1500 µg GnRH in 24-stündigem Abstand bei einem Bullen (Ambinon-FSH = 0,33 x NIH-FSH-B₁)

Tabelle 12:

Zusammenfassung der Versuche mit intramuskulärer Injektion von Gonadoliberin
 (Standard AMBION-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

Dosierung	Anzahl Versuche (n)	Basalwert (ng/ml) $\bar{x} \pm s$	Gipfelwert (ng/ml) $\bar{x} \pm s$	Endwert (ng/ml) $\bar{x} \pm s$	Zeit bis Peak (Min) $\bar{x} \pm s$	Zeitdauer erhöhter Werte (Min) $\bar{x} \pm s$	Quotient Gipfel-/Basalwert $\bar{x} \pm s$
15	1	322	37	356	37	18	1,1
62,5	4	228	85	446	200	261	1,8
250	7	251	59	551	193	238	2,0
500	5	206	84	842	467	225	3,7
1000	1	483	93	1473	105	53	3,0
1500	20	324	161	723	310	331	2,3
3000	1	402	13	957	110	54	2,3

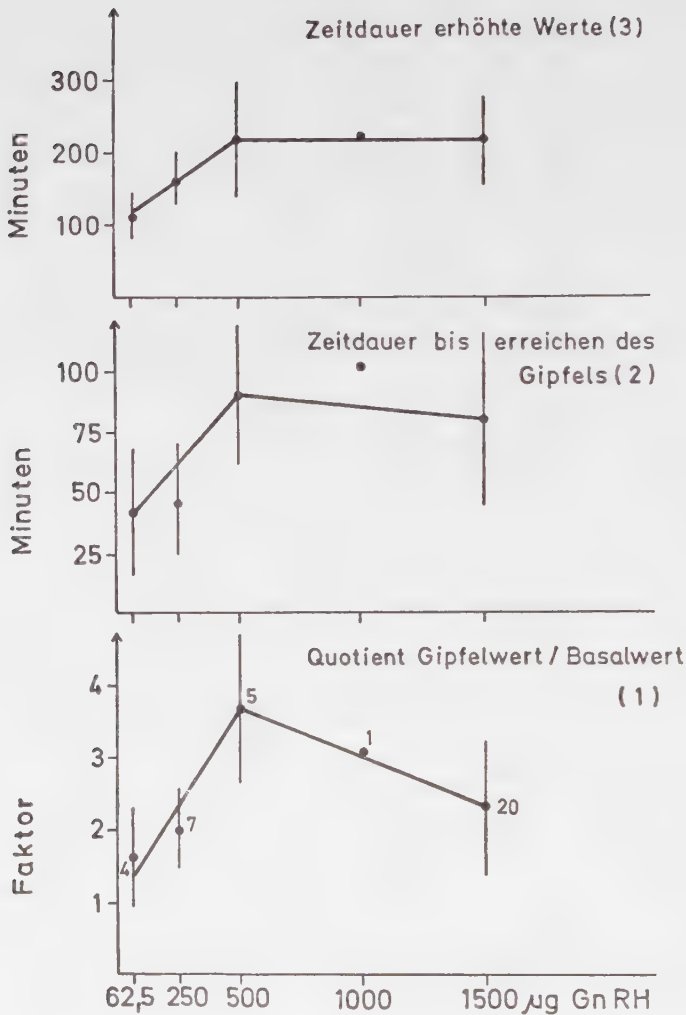


Abbildung 42:

Dosis/Wirkungsbeziehungen nach intramuskulären GnRH-Injektionen

- 1) Maximale FSH-Erhöhen ausgedrückt als Quotient Gipfel-/Basalwert
- 2) Zeitdauer bis Erreichen des Gipfelwerts
- 3) Dauer der erhöhten Werte

Mittelwerte mit Standardabweichungen nach 62,5, 250, 500, 1000 und 1500 µg GnRH mit Angabe der Anzahl durchgeführter Versuche

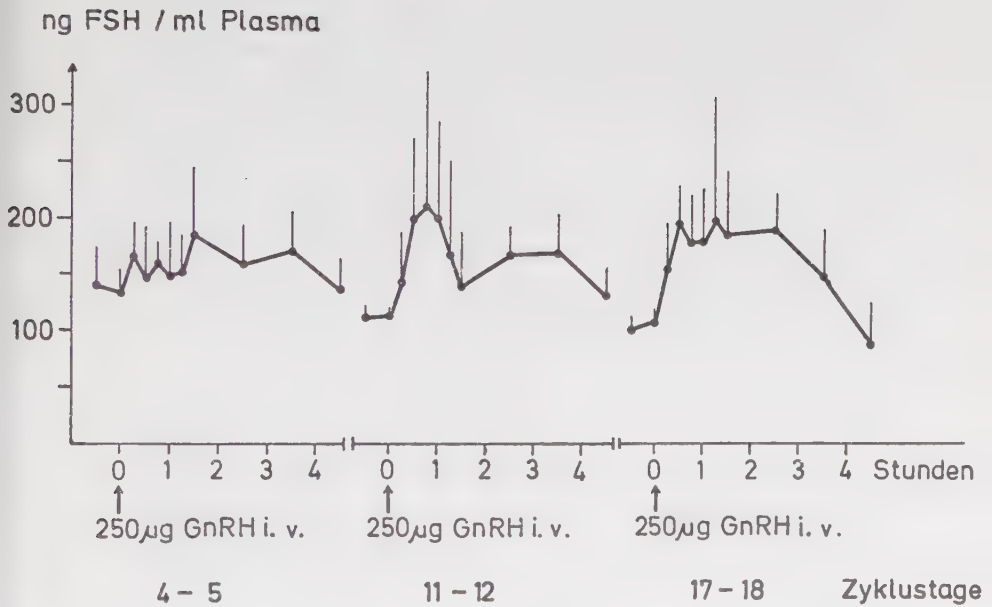


Abbildung 43:

Zyklusabhängigkeit der FSH-Freisetzung nach intravenöser Injektion von 250 μ g GnRH bei Kalbinnen am Tag 4 - 5 (4 Tiere), 11 - 12 (4 Tiere) und 17 - 18 (3 Tiere); Mittelwerte der Versuche mit positiver Standardabweichung

beiden vorausgehenden Versuchstage, wogegen mit der Dosis von 500 µg GnRH am Tag 12 die beste Reaktion ($p < 0,05$) festgestellt werden konnte, jedoch war die Freisetzung am 18. Zyklustag ebenfalls signifikant höher als am 5. Zyklustag.

FSH-Freisetzung nach Corpus luteum-Enukleation:

Bei 4 Kalbinnen wurden in 6 Versuchen in unterschiedlichen Zyklusstadien die Gelbkörper manuell abgedrückt; 5 - 40 Stunden nach der Enukleation wurde jeweils 1500 µg GnRH i.m. verabreicht. Alle Tiere zeigten nach der Injektion sehr hohe FSH-Freisetzungen (siehe Tabelle 13). Die beste FSH-Ausschüttung konnte beim Tier "Rocki-Maus" gemessen werden, bei dem Follikelwachstum und nachfolgend Ovulation festgestellt werden konnte (Abbildung 44). Binnen 95 Minuten steigen hier die FSH-Werte von 266 ng/ml auf 1500 ng Ambinon-FSH/ml an (Umrechnung: Ambinon-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$), um danach wieder gleichförmig abzufallen, 4 1/2 Stunden nach dem drastischen Anstieg sind wieder die Ausgangswerte erreicht.

FSH-Freisetzung während der post-partum-Phase:

Fünf Kühen wurde am 12. bis 15. Tag p.p. je 1500 µg Gonadoliberin injiziert. Die Tiere zeigten erhebliche Unterschiede in ihrer Reaktion auf das Releasinhormon (siehe Tabelle 13). Beim Tier "Kakwi" war der deutlichste FSH-Anstieg, allerdings nur für kurze Zeit, nachweisbar. Die Kühe "Kalipri", "Karo" und "Nydo" reagierten nur mit sehr geringer FSH-Erhöhung ("Karo" und "Nydo" hatten zudem ein hohes FSH-Ausgangsniveau).

Trotz dieser sehr unterschiedlichen FSH-Beeinflussung durch GnRH ovulierten neben "Kaki" auch die Kühe "Karo" und "Nydo". Eine interessante Sonderstellung nimmt die Kuh "Kabine" in diesem Geschehen ein (siehe Abbildung 45): sie ließ eine gute FSH-Reaktion erkennen, zeigte Follikelwachstum, bildete aber nach der Ovulation eine harte, derbwandige Zyste an der Stelle des Follikels am Ovar an. Beginnend 3 Tage nach der Injektion steigen die FSH-Spiegel innerhalb von 5 Tagen dramatisch von 340 ng/ml über 559, 851, 1080 auf 1868 ng Ambinon-FSH/ml an, um weitere 35 Tage auf einem Niveau zwischen 1293 bis 2095 ng/ml zu verharren; ab dem 30. Tag p.p. ist eine leichte Tendenz langsam ab-

Taballe 13:

Parameter der FSH-Freisetzung nach intramuskulärer Injektion von $1500 \mu\text{g GnRH}$ nach Gelbkörperenukleation und während der post-partum-Phase (Standard AMBION-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

Tier	Eukleation Zyklustag	Basalwert ng/ml	Gipfelwert ng/ml	Endwert ng/ml	Zeit bis Peak (Mdn)	Zeitdauer er- höhter Werte (Mdn)	Quotient Gipfel-/ Basalwert
Roschli	8	220	599	243	70	260	2,7
Rocki-Maus	13	212	1500	224	95	300	7,1
Susi (I)	14	97	490	74	55	140	5,1
Susi (II)	11	160	533	159	85	260	3,3
Zenzi (I)	13	235	910	182	100	240	3,9
Zenzi (II)	13	251	827	223	120	190	3,9
Tage p.p.							
Kakwi	14	136	577	182	25	95	4,1
Nydo	12	822	1120	910	50	220	1,4
Kalipri	15	236	280	237	20	40	1,8
Karo	12	629	671	497	50	-	1,1
Kabine	13	222	437	243	20	165	2,0

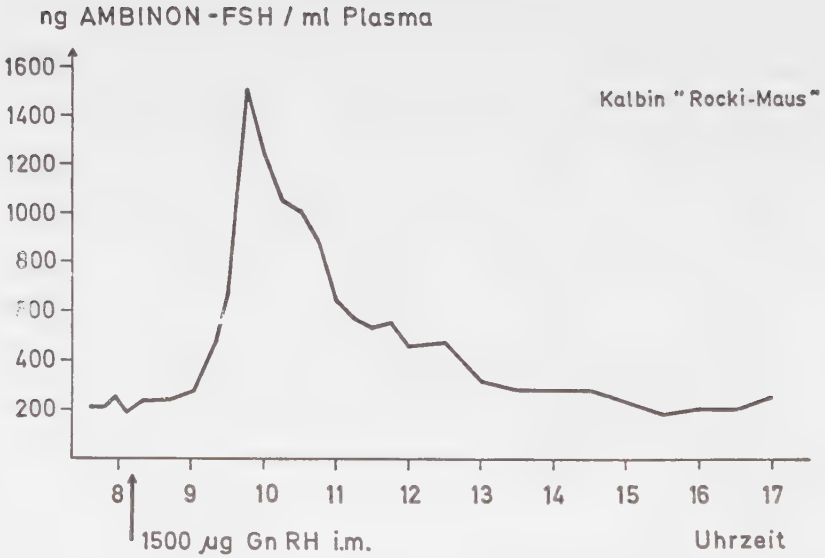


Abbildung 44:

FSH-Freisetzung mit 1500 µg GnRH i.m. 24 Stunden nach Gelbkörper-
enukulation am 13. Zyklustag bei einer Kalbin

(Ambinon-FSH = $0,33 \times \text{NIH-FSH-B}_1$)

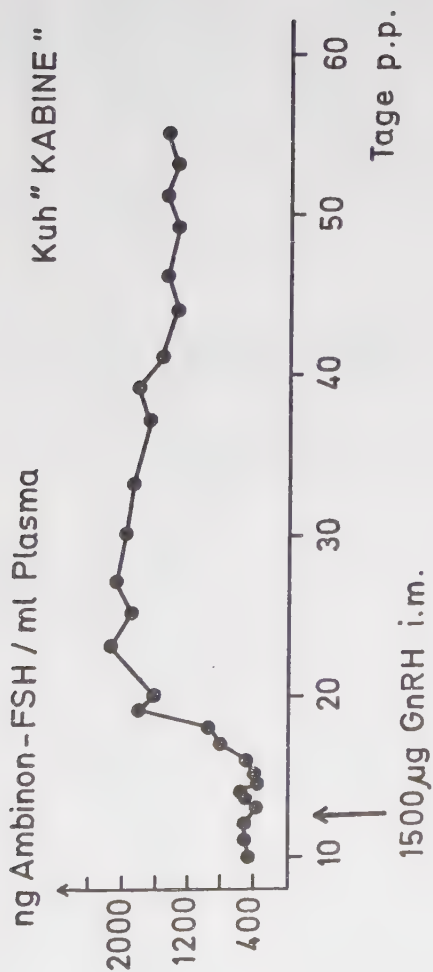


Abbildung 45:

Zystenbildung bei einer Kuh während der post-partum- Periode nach
 Injektion von 1500 µg GnRH i.m. am 13. Tag p.p.
 (Ambinon-FSH = 0,33 x NIH-FSH-B₁)

fallender Werte erkennbar, doch bleibt das Niveau wesentlich überhöht.

Altersabhängigkeit der FSH-Freisetzung:

In zwei Versuchsreihen wurden je 2 männlichen und weiblichen Kälbern in ungefähr dreiwöchigem Abstand eine konstante Dosis von 1 µg GnRH/kg Körpergewicht injiziert (Versuch 1); daneben wurden in einem weiteren Experiment 2 weiblichen Kälbern und einem männlichen Kalb eine gleichbleibende Dosis von 250 µg GnRH i.m. injiziert (Versuch 2), um eine eventuell unterschiedliche Ansprechbarkeit der Hypophyse auf Releasinghormon-Gaben vor, während und nach der Pubertät feststellen zu können.

Versuch 1:

In den Tabellen 14 und 15 sind getrennt für die männlichen und weiblichen Tiere das jeweilige Alter während der einzelnen Versuchstage, die Injektionsdosis (= Körpergewicht in kg), die Injektionsart, die FSH-Basal- und Gipfelwerte, die Zeitdauer bis zum Erreichen des Gipfelwerts und die Fläche unter der Kurve (ausgedrückt in Flächeneinheiten) dargestellt.

Bei den männlichen Kälbern "Gerd" und "Gilch" konnte stets ein deutlicher Anstieg der FSH-Konzentrationen gemessen werden (siehe Abbildung 46), wobei jedoch drei getrennte Perioden unterschieden werden können: eine erste bis zu 52 Tage Alter mit geringer, eine zweite bis 176 Tage Alter mit deutlich gesteigerter und eine dritte ab 227 Tage Alter mit wieder geringerer FSH-Freisetzung. Während Periode II wird der Gipfelwert der FSH-Freisetzung im allgemeinen nach 15 Minuten erreicht, während Periode III nach 30 Minuten. Für die 2 weiblichen Kälber dieses Experiments (siehe Tabelle 15 und Abbildung 46) konnte bis zur Pubertät keine klare Altersabhängigkeit der Follicotropin-Freisetzung gefunden werden, die bei diesen weiblichen Tieren bezüglich Gipfelhöhe und Gesamtfreisetzung hochsignifikant ($2p < 0,001$) geringer als bei den männlichen Tieren war. Die FSH-Maxima überstiegen nie 171 ng NIH-FSH-B₄/ml, wohingegen sie bei den männlichen Kälbern mit 2 Ausnahmen (im Alter von 19 und 30 Tagen) stets darüber lagen.

Tabelle 14:

Altersabhängigkeit der FSH-Freisetzung nach GnRH bei männlichen Kälbern (Dosierung 1 µg/kg Körpergewicht)

"Gerd" Alter	"Gilch" (Tage)	Dosis GnRH µg	Injektions- art	Basalwert (ng/ml)	Gipfelwert (ng/ml)	Zeit bis Gipfelwert (Min)	Fläche unter der Kurve (Flächeneinheiten)
19		67	i.m.	93	141	30	15
	30	67	i.m.	102	141	15	11
40		89	i.m.	88	190	30	19
	52	93	i.m.	87	171	45	13
69		102	i.v.	112	190	15	40
	80	106	i.v.	145	230	15	24
87		120	i.v.	126	230	15	69
	101	140	i.v.	123	233	15	50
109		146	i.v.	154	229	15	55
	121	154	i.v.	149	248	15	48
135		165	i.v.	102	181	30	46
	150	178	i.v.	160	238	15	35
172		188	i.v.	93	187	15	41
	176	197	i.v.	158	242	15	41
227		250	i.v.	119	178	30	27
	232	285	i.v.	117	200	30	46
283		290	i.v.	138	204	30	28
	295	300	i.v.	199	217	30	19

Tabelle 15:

Altereabhängigkeit der FSH-Freisetzung nach GnRH bei weiblichen Kälbern
(Dosierung 1 µg/kg Körpergewicht)

"Klewa" Alter (Tage)	"Klara" Alter (Tage)	Dosis GnRH (µg)	Injektions- art	Basalwert (ng/ml)	Gipfelwert (ng/ml)	Zeit bis Gipfelwert (Min)	Fläche unter der Kurve (Flächeneinheiten)
11		35	i.v.	79	105	30	4
31		60	i.v.	66	96	30	13
53		76	i.v.	75	96	15	15
	78	104	i.m.	149	160	30	8
81		100	i.v.	82	106	30	16
	108	117	i.m.	106	133	45	4
118		113	i.v.	77	88	30	6
	139	115	i.v.	87	105	75	11
	161	135	i.v.	95	149	45	24
165		140	i.v.	107	136	30	13
	176	137	i.v.	85	94	45	13
	205	156	i.v.	109	keine Reaktion nachweisbar		
230		160	i.v.	110	157	30	23
	232	174	i.v.	63	keine Reaktion nachweisbar		
	268	200	i.v.	117	171	60	18
	352	250	i.v.	106	128	75	13

Erste festgestellte Brunst: Kalb Klewa 233 Tage Alter
Kalb Klara 279 Tage Alter

Versuch 2:

Bei der gleichbleibenden Dosierung von 250 µg GnRH/Tier (siehe Tabelle 16 und Abbildung 47) zeigen insbesondere die beiden weiblichen Kälber, verglichen mit Versuch 1, deutlich erhöhte und länger andauernde Follitropin-Anstiege. Das männliche Tier weist jedoch auch hier eine gesteigerte FSH-Freisetzung auf.

Versuche mit dem Gonadoliberin-Analog Hoe 766:

Das synthetische Releasinhormon-Analog Hoe 766 wurde uns freundlicherweise von den Farbwerken Hoechst AG, Frankfurt/Main, zur Verfügung gestellt; das Präparat wurde vor der Applikation mit phys. NaCl verdünnt. Mit 15 Kalbinnen wurden Versuche mit diesem GnRH-Analog, das in abgestuften Dosierungen von 5 bis 50 µg intramuskulär injiziert wurde, durchgeführt; alle Tiere befanden sich in der Lutealphase eines regelmäßigen Zyklus; Blutproben wurden während einer 10 1/2-stündigen Versuchsdauer jeweils in 30 Minuten Abstand gezogen.

Dosis-Wirkungsbeziehungen bei intramuskulärer Injektion:

Auch mit der im Vergleich zur GnRH-Originalsubstanz geringeren Injektionsdosis konnte in jedem Fall eine deutliche FSH-Erhöhung festgestellt werden (siehe Abbildung 48); die Mittelwertkurven aus Individualwerten zeigen einen relativ glatten Verlauf bei nur geringen Standardabweichungen. Die Freisetzungsscharakteristika der einzelnen Konzentrationsstufen sind in Tabelle 17 zusammengestellt; bis zur Dosis von 30 µg können steigende Gipfelwerte und steigende Flächeneinheiten als Maß der Gesamthormonfreisetzung gefunden werden; der Quotient Gipfel-/Basalwert erreicht ebenfalls bei dieser Konzentration sein Maximum.

Wirkungsvergleich mit der GnRH-Originalsubstanz:

Beim Vergleich der Wirkungen des Gonadoliberins (Hoe 471) und des GnRH-Analogs (Hoe 766) (siehe Tabelle 18) fällt beim Analog eine durchschnittlich etwas längere Wirkungsdauer auf, auch wird der Gipfel der Freisetzung später erreicht. Da jedoch keine Parallelität von Dosis-Wirkungskurven beider Präparate aufgezeigt werden konnte,

Tabelle 16:

Altersabhängigkeit der FSH-Freisetzung nach GnRH bei Kälbern (konstante Injektionsdosis von 250 µg GnRH)

männliches Kalb:

¹ Zar ¹ (Alter Tage)	Dosis GnRH (µg)	Injektions- art	Basalwert (ng/ml)	Gipfelwert (ng/ml)	Zeit bis Gipfelwert (Min)	Fläche unter der Kurve (Flächeneinheiten)
---	--------------------	--------------------	----------------------	-----------------------	---------------------------------	--

29	250	i.m.	75	187	30	18
48	250	i.m.	78	175	30	63
285	250	i.m.	168	279	15	43

weibliche Kälber:

¹Nora¹ ¹Karola¹

10	250	i.m.	113	152	15	32
15	250	i.m.	87	129	75	21
41	250	i.m.	153	207	30	28
46	250	i.m.	151	145	45	22
70	250	i.m.	87	147	45	46
75	250	i.m.	40	95	45	43
391	250	i.m.	171	200	60	19
396	250	i.m.	68	142	60	51

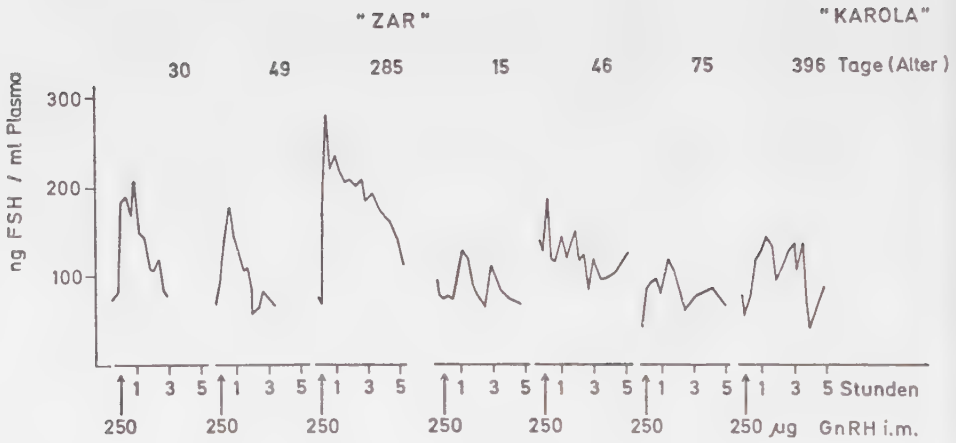


Abbildung 47:

Altersabhängigkeit der FSH-Freisetzung bei einem männlichen ("Zar") und weiblichen Kalb ("Karola") nach Injektionen von 250 µg GnRH

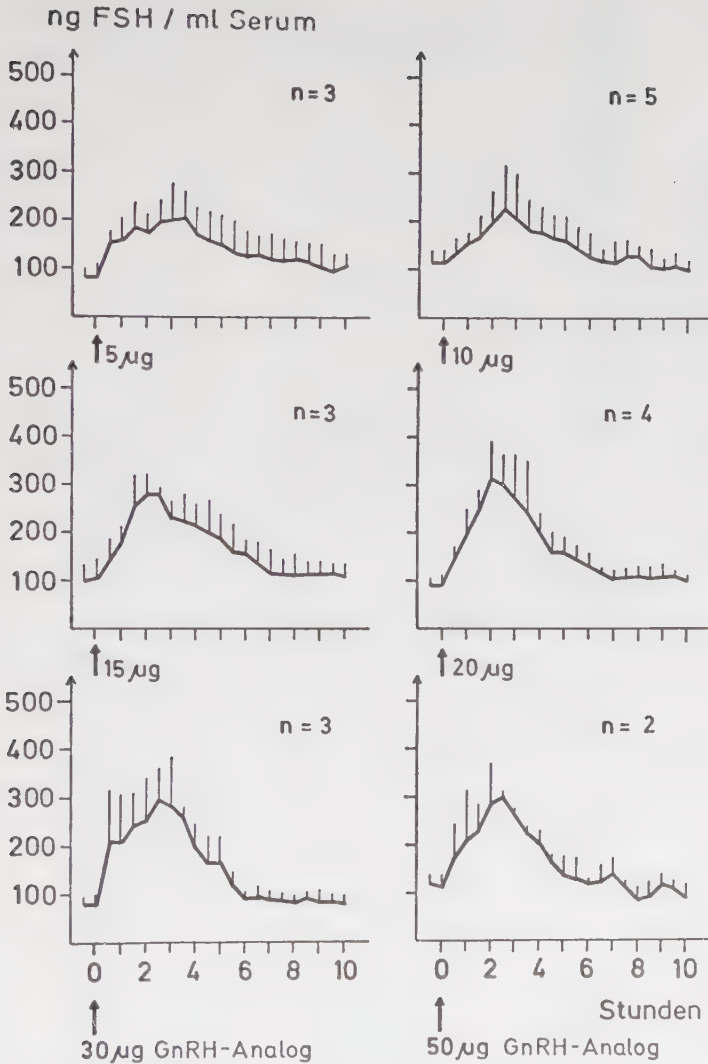


Abbildung 48:

FSH-Freisetzung bei Kalbinnen während der Lutealphase des Zyklus nach intramuskulärer Injektion von 5, 10, 15, 20, 30 und 50 µg GnRH-Analog (Hoe 766); Mittelwerte mit positiver Standardabweichung, 30-minütige Blutentnahmefrequenz

Tabelle 17:

Charakteristika der FSH-Freisetzung nach intramuskulärer Injektion des GnRH-Analogs Hoe 766 bei Kalbinnen (Lutealphase)

Tierzahl (n)	Dosis GnRH- Analog (µg)	Basalwert (ng/ml)		Gipfelwert (ng/ml)		Zeit bis Gipfelwert (Min)		Zeitdauer er- höhter Werte (Min)		Quotient Gipfel-/ Basalwert		Fläche unter der Kurve (Flächeneinheiten)		
		$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	
3	5	95		41	218	68	125	46	300	120	2,4	0,6	33,3	12,0
5	10	112		27	231	69	168	44	336	54	2,1	0,6	44,9	9,3
3	15	103		35	297	21	105	30	325	61	3,1	1,0	54,2	15,7
4	20	88		13	319	81	128	16	282	62	3,7	1,1	62,1	23,1
3	30	79		13	334	74	150	46	270	30	4,4	0,7	66,4	6,5
2	50	115		31	317	21	120	21	270	42	2,8	0,6	54,9	13,7

Tabelle 18:

Wirkungsvergleich von GnRH und GnRH-Analog nach intramuskulärer Injektion

	GnRH (μg)				GnRH-Analog (μg)			
	62,5	250	500	1500	5	10	20	30
Injektionsdosis								
Zeitdauer erhöhter Werte (Min)	111	167	234	226	300	336	282	270
Quotient Gipfel-/Basalwert	1,8	2,0	3,7	2,3	2,4	2,1	3,7	4,4

läßt sich kein direkter Vergleich ihrer Wirkungen durchführen. Aus einer Gegenüberstellung der Konzentrationen von 500 µg Originalsubstanz und 20 µg GnRH-Analog läßt sich eine 25-fache Wirkpotenzierung ablesen, da hier die Quotienten von Basal-/Gipfelwerten nahezu gleich sind. Die übrigen Dosierungsstufen lassen sich nicht direkt einander zuordnen.

3.12. Versuche mit Thyroliberin (TRH)

Das synthetische Thyroliberin wurde uns von den Farbwerken Hoechst AG zur Verfügung gestellt. An 4 Kühen und zwei Bullen wurden Versuche zur Freisetzung von FSH nach TRH-Injektionen durchgeführt, wobei Blutproben in fünf- bis 30-minütigem Intervall gezogen wurden. Die 2 Bullen erhielten in 3-stündigem Abstand 50, 250 und 500 µg TRH intravenös gespritzt; wie aus Abbildung 49 ersichtlich, zeigten die Tiere nach der ersten Injektion von 50 µg TRH i.v. einen deutlichen, wenn auch nicht sehr hohen FSH-Anstieg, der für 90 Minuten auf erhöhtem Niveau verharrte; die folgende Injektion von 250 µg i.v. bedingte eine zweite zusätzliche Freisetzung mit nochmals erhöhten Werten für etwa 2 Stunden, die 3. Injektion bewirkte nur noch einen sehr geringen Anstieg. Zwei Kühen wurde ebenfalls in 3-stündigem Intervall 100, 250 und 500 µg TRH i.v. verabreicht (Abbildung 50); die Reaktion beim Tier "Roja" ist deutlich besser als bei "Roki", welches nur nach 250 µg eine minimale Freisetzung aufweist. Bei 2 Versuchen an Kühen, welchen 150 und 500 µg TRH bzw. 500 und 1000 µg TRH intramuskulär innerhalb von 4 Stunden injiziert wurde, konnte keine FSH-Freisetzung gemessen werden.

3.13. Versuche zur Superovulation mit PMSG

Bei 5 Kalbinnen wurden FSH-Messungen im Rahmen von Superovulationsversuchen mit PMSG durchgeführt; während eines Versuchszeitraumes von 13 Tagen wurden 4 mal täglich Blutproben gewonnen. Den Tieren wurde am 6., 10., 11., 13. bzw. 19. Zyklustag 1900, 2100, 2300, 1800 bzw. 1700 I.E. PMSG intramuskulär verabreicht, 48 Stunden

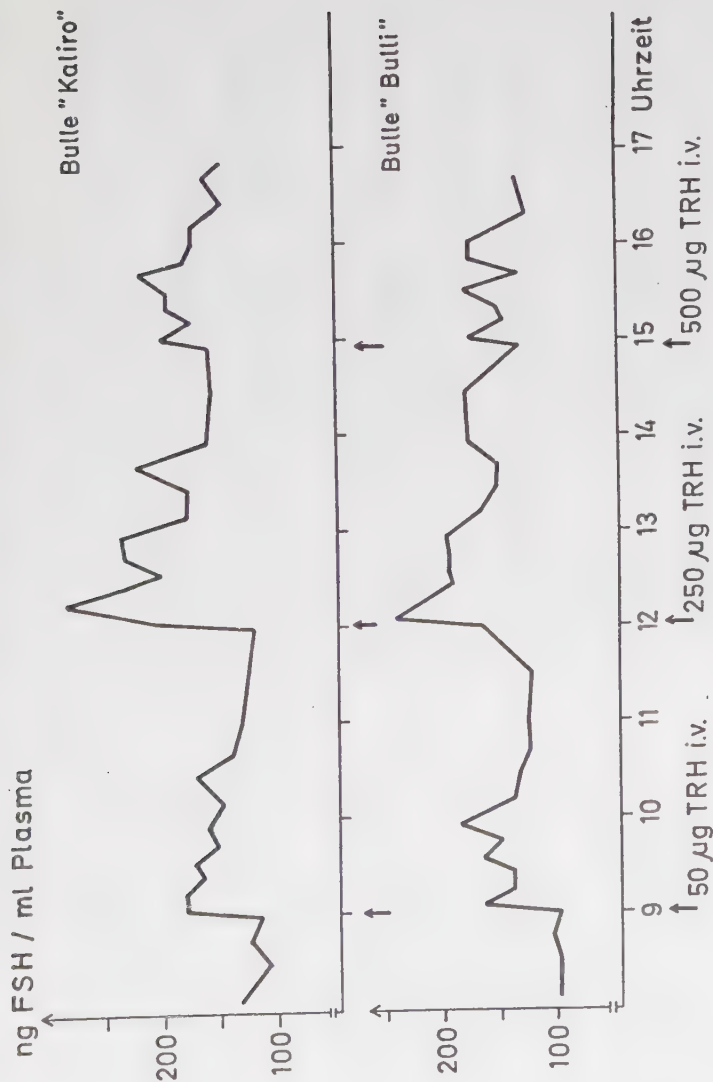


Abbildung 49:

FSH-Werte von 2 Bullen nach intravenösen Injektionen steigender Dosierungen von TRH in 3-stündigem Abstand (50, 250 und 500 µg TRH)

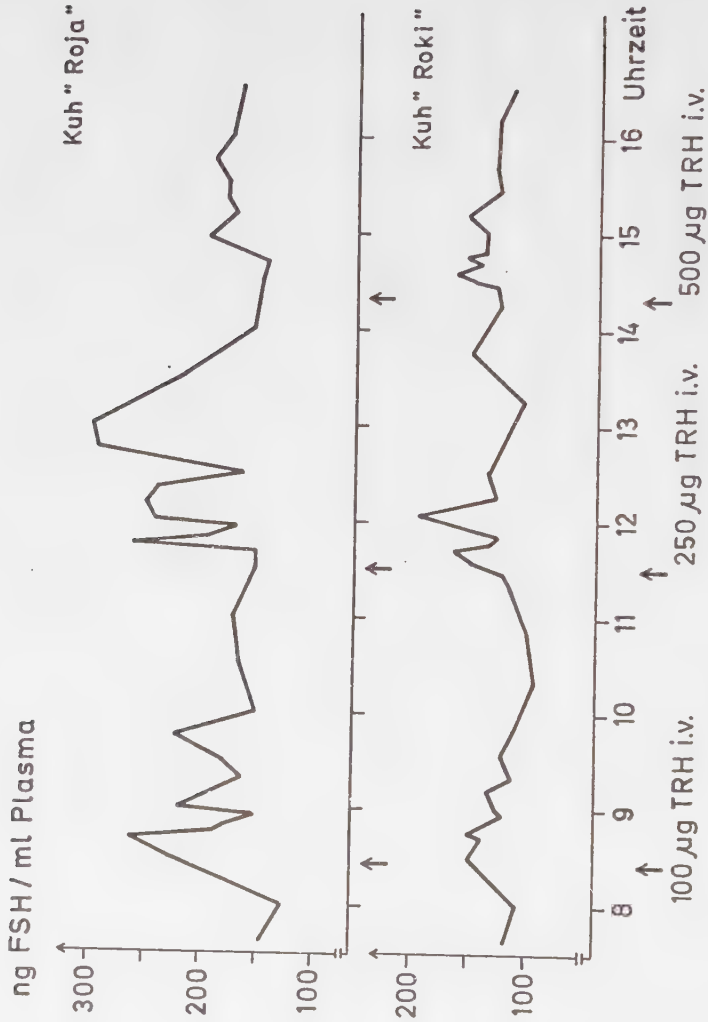


Abbildung 50:

FSH-Werte von 2 Kühen nach intravenösen Injektionen steigender Dosierungen von TRH in 3-stündigem Abstand (100, 250 und 500 µg TRH)

später wurden je 0,5 mg Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analog ICI 80 996 i.m. zur Einleitung einer Luteolyse injiziert; während der nachfolgenden Brunst, während der die Tiere viermal künstlich besamt wurden, trat bei allen Kalbinnen ein sehr deutlicher FSH-Peak 45, 39, 63, 63 und 39 Stunden nach der Prostaglandin-Analog-Injektion auf; ein Beispiel ist in Abbildung 51 wiedergegeben.

3.14. Versuche mit einem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analog (ICI 80 996)

Das synthetische Prostaglandin-Analog wurde uns von den Imperial Chemical Industries, Macclesfield, Cheshire, Großbritannien, überlassen. Drei Kalbinnen und drei Kühen wurden während der Lutealphase des Zyklus je 0,5 mg ICI 80 996 (Estrumate^R) i.m. injiziert; während einer 9-stündigen Intensivperiode nach der Injektion wurden Blutproben in 15- bis 60-minütigem Abstand aus eingelegten Dauerkathetern entnommen, während der nachfolgenden Tage wurden viermal täglich Blutproben gezogen.

Die Injektion zeitigte bei keinem Tier einen unmittelbaren Einfluß auf die FSH-Sekretion, die - abgesehen von episodischen Schwankungen - auf Ausgangsniveau verharrte. Erst 36 bis 48 Stunden nach der Injektion treten vor und während der einsetzenden Brunst FSH-Erhöhungen auf.

3.15. Versuche mit einem Prolaktin-Inhibitor 2-Br- α -Ergokryptin-Methansulfonat (CB 154)

Dieses Ergoalkaloid wurde uns von der Sandoz AG, Basel, Schweiz, überlassen; unmittelbar vor der Injektion wird es in 40 % Alkohol gelöst und mit physiologischer NaCl verdünnt.

Eine einmalige intravenöse Injektion von 100 bzw. 150 mg CB-154 bei 3 Tieren bewirkte während der folgenden 24 bis 48 Stunden, in denen intensiv (mindestens stündlich) Blut genommen wurde, keine meßbare FSH-Beeinflussung.

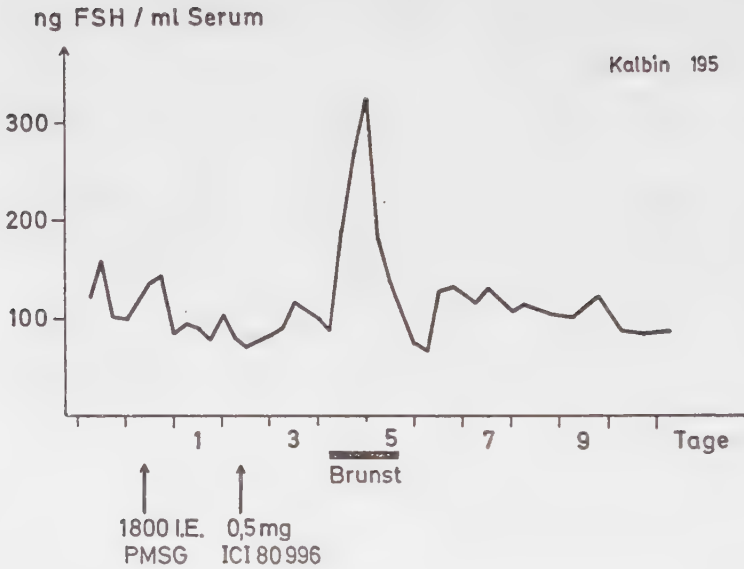


Abbildung 51:

FSH-Werte bei einer Kalbin während eines Superovulationsversuchs nach intramuskulären Injektionen von 1800 I.E. PMSG (Anteron^R) und 0,5 mg Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analog ICI 80 996 (Estrumate^R) in 48-stündigem Abstand

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der methodischen Entwicklungsarbeiten

Die Brauchbarkeit dieses kreuzreagierenden Radioimmotests zur Bestimmung von bovinem FSH wird durch das Erfüllen allgemeiner Gültigkeitskriterien für radioimmunologische Hormonbestimmungen verdeutlicht. Die Parallelität der Verdünnungskurven von endogenem und exogenem (Standard-)Hormon unterstreicht deren gleichartige Reaktion. Plasma- oder Serum-Proteinbestandteile interferieren nicht erkennbar in diesem System, ausgedrückt durch die Linearität von Wiederfindungskurven zugesetzten FSH's aus Serum- oder Plasmaproben. Dagegen fanden bei homologen Schaf-FSH-RIT's Bailly du Bois et al. 1970 und Salamonsen et al. 1973 a stark ausgeprägte Serum-Interferenz-Phänomene, die dazu zwangen, heterologe Systeme zu entwickeln.

Aufgrund der relativ geringen biologischen Aktivität und der geringen Reinheit der bovinen Standardpräparate mußte hochgereinigtes Schaf-FSH als Antigen zum Markieren und zur Immunisierung verwendet werden. Das gewonnene Antiserum weist identische immunologische Reaktion von bovinem und ovinem FSH auf; bei der Antikörperproduktion wurde nur viermal immunisiert, um den Anteil unspezifischer Kreuzreaktionen möglichst gering zu halten. Nach Odell et al. 1968 kann der Titer zwar durch häufigeres Nachimmunisieren wesentlich gesteigert werden, jedoch bedingt dies oft einen Rückgang an Spezifität; als Versuchstiere zur FSH-Antikörpergewinnung haben sich Meerschweinchen als die geeignetste Spezies erwiesen (Faiman und Ryan 1969, Schlaff et al. 1968), da sie native Hormone aufweisen, die denjenigen anderer Spezies sehr unähnlich sind. Um Unspezifitäten weitgehend auszuschließen, wurde das gewonnene Antiserum zusätzlich mit Blutserum eines hypophysektomierten Schafs präabsorbiert, weiterhin konnte durch Zugabe einer ausgetesteten Menge von LH- und TSH-Standardsubstanz in jedes Inkubationsröhrchen eine geringgradige Kreuzreaktion mit diesen beiden hypophysären Hormonen ausgeschaltet werden. Dies ist zulässig wenn ab einer bestimmten Konzentration kreuzreagierenden Hormons ein Plateau in der resultierenden Dosis-Wirkungskurve auftritt (Hendrick und Franchimont 1973).

Durch die Einführung der enzymatischen Markierungsmethode konnte gegenüber der bis dahin gebräuchlichen Chloramin-T-Methode der "Immunodamage" nachhaltig gesenkt werden, was für human- und Schaf-FSH Rogol und Rosen 1974 ebenfalls bestätigten.

Ein Problem ist allerdings das nahezu identische Verhalten von Hormon und von Lactoperoxidase bei der Gelfiltration nach Einbau radioaktiven Jods bei der Markierung, allerdings kann dies bei einer Papierelektrophorese aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit erkannt werden. Um die Markierung möglichst schonend auszuführen, werden nur äußerst geringe Konzentrationen von Wasserstoffsuperoxid und Lactoperoxidase bei möglichst langer Reaktionszeit eingesetzt; da das Enzym eine relativ kurze Halbwertszeit aufweist (Hunter 1974), braucht nach 15 Minuten Reaktionszeit die Markierung nicht abgestoppt zu werden. Der isoelektrische Punkt des Enzyms stimmt mit dem pH seines Wirkoptimums überein, gleichzeitig scheint auch das zu markierende Schaf-FSH an seinem isoelektrischen Punkt von pH 5,0 am stabilsten zu sein.

4.2. Diskussion der physiologischen Ergebnisse

Bei der Bestimmung der biologischen Halbwertszeit von bovinem FSH zeigte sich ähnlich wie bei bovinem Prolaktin (Schams 1974) ein aus zwei verschiedenen schnellen Komponenten bestehender Abfall; es ergab sich kein Unterschied nach einem endogenen episodischen Gipfel im Vergleich mit exogen zugeführtem FSH oder mit Releasinghormon provozierte Freisetzung, was darauf schließen läßt, daß jeweils immunoreaktiv identisch wirksames FSH im RIT gemessen wurde.

Nach Infusion hoher Östrogen-Mengen wurde die FSH-Sekretion signifikant unterdrückt (von Hausler und Malven 1976 ebenfalls für die LH-Sekretion kastrierter Kalbinnen festgestellt). Bei ovariectomierten Frauen konnten Wallach et al. 1970 Erniedrigungen der FSH-Spiegel bis zu 20 % nach Östradiolbenzoat-Verabreichung messen, episodische Fluktuationen liefen jedoch auf verändertem Niveau weiter. Die Befunde, daß niedrige Östrogenkonzentrationen FSH stimulieren, höhere aber unterdrücken, läßt die unmittelbare Abhängigkeit beider Hormone erkennen, was insbesondere die Schwankungen während des Zyklus erklären könnte.

Bei der Kastration eines männlichen Kalbes treten diese Abhängigkeiten ebenfalls deutlich vor: nach dem Wegfall negativer Feedback-Mechanismen nach der Orchidektomie steigen die FSH-Spiegel im peripheren Blut stark an, die episodischen Hormonveränderungen bleiben davon jedoch unbeeinflusst, was auch Ostergard et al. 1970 bei Männern beobachteten.

Da Kochsalzinfusionen und auch Manipulationen am Tier keine Veränderungen der FSH-Sekretion bedingen, erscheint eine durch "Stress" ausgelöste FSH-Beeinflussung unwahrscheinlich, zudem konnten bei einer Vielzahl von Versuchen zur episodischen FSH-Ausschüttung nie Veränderungen im Hormonspiegel gemessen werden, die periodisch auftraten oder die irgendwelchen exogenen Vorgängen zuzuordnen gewesen wären.

Während der präpuberalen und puberalen Periode zeigen monatliche FSH-Mittelwerte bei männlichen Rindern teilweise signifikanten Anstieg. Die Erhöhungen der FSH-Spiegel bei drei von vier männlichen Kälbern beginnen frühestens im Alter von 6 Monaten, was wohl mit der beginnenden Geschlechtsreife zusammenfällt, da nach Leidl und Biegert 1967 die Pubertät bei Fleckviehbulen im Alter von 6 bis 10 Monaten auftritt. Die in zwei Phasen verlaufenden FSH-Erhöhungen gehen zeitlich parallel einher mit einem biphasischen Testosteron-Anstieg (Giménez 1975, Karg et al. 1976 a); schon McMillan und Hafs 1969 konnten am Fruktose-Gehalt von Samenplasma einen ähnlichen zweiphasigen Anstieg während der Pubertät messen. Bei 8 Kälbern, von denen vom 3. bis 8. Lebensmonat Blutproben untersucht wurden, konnte zwar wegen der zu kurzen Versuchsperiode keine Biphasigkeit des FSH-Anstiegs festgestellt werden, wohl aber eine signifikante Basisspiegelerhöhung. Bei weiblichen Rindern scheinen Veränderungen während des beginnenden Brunstzyklus eventuelle pubertäre Einflüsse zu überlagern.

Obwohl in den Langzeitpubertätsstudien bei männlichen Tieren eine Korrelation zwischen FSH- und Testosteron-Werten auftritt, ist doch wohl LH und nicht FSH das maßgebliche Hormon für die Leydigzellfunktion (Crim und Geschwind 1972, Galloway und Pelletier 1975); vielleicht drückt

dies aber eine Induktion der Rezeptorempfindlichkeit und eine gleichzeitige Vermehrung der Anzahl der LH-Rezeptoren durch FSH aus, ähnlich wie es Ketelslegers et al. 1976 bei der Ratte experimentell nachweisen konnten. FSH spielt während dieser beginnenden pubertären Umstellung beim männlichen Geschlecht wohl eine direkte Rolle bei der Synthese des "Androgen bindenden Proteins" in den Sertolizellen im Hoden, welches den vermehrten Transport von Androgenen zum Keim-epithel und zum Nebenhoden ermöglichen soll (Hansson et al. 1973 a, b und 1974). Eine zusätzliche Modulation der FSH-Sekretion erfolgt durch das Hormon "Inhibin", das ebenfalls in den Sertolizellen gebildet wird (Steinberger und Steinberger 1976) und 1974 erstmals von Franchimont und Chari im Seminalplasma von Bullen als FSH erniedrigendes Prinzip erkannt worden war. An Experimenten bei Ratten fanden Odell et al. 1973 schon Hinweise für eine Induktion der Rezeptorempfindlichkeit im Hoden für LH ausgelöst durch FSH, wie es ebenfalls Karg et al. 1976 a bei Bullen vermuteten. Auch beim weiblichen Tier wird ein "Inhibin", das von den Granulosazellen im Ovar gebildet werden soll, diskutiert (DeJong und Sharpe 1976 a).

Nachdem lange Zeit zur Beschreibung des Hormonprofils während des Brunstzyklus beim Rind nur die Veränderungen der LH- (Schams und Karg 1969, Hansel und Snook 1970, Cummins et al. 1972), der Progesteron- (Stabenfelat et al. 1969, Henricks et al. 1971, Hoffmann et al. 1973) und der Östrogen-Werte (Henricks et al. 1971, Glencross und Pope 1972, Shemesh et al. 1972, Peterson et al. 1975) verfügbar waren, konnten durch radioimmunologisch bestimmte FSH-Werte (Akbar et al. 1974, Dérivaux et al. 1974, Schams et al. 1974) zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden.

Die während des Zyklus bei Kalbinnen und Kühen gefundenen 4-tägigen Wellen im Follicotropinverlauf decken sich gut mit einem Computermodell eines 4 - 5 tägigen Ovar-Follikel-Wachstums (Lewis et al. 1972); bei pelviskopischen Beobachtungen am Rinder-Ovar parallel zu FSH-Stimmungen während des Zyklus (Schams et al. 1976) zeigte sich ebenfalls ein schubweises Follikelwachstum etwa zum Zeitpunkt der FSH-Wellen. Einen gewissen Zusammenhang von FSH- und Östradiol-Veränderungen

leiten Dérivaux et al. 1976 aus dem Zusammentreffen von FSH-Erhebungen und von Östrogen-Anstiegen um den 6. und 12. Zyklustag ab. Henricks et al. 1971, Hansel und Schächter 1972 fanden ebenfalls Östrogenpeaks etwa 4 - 5 und 7 - 9 Tage nach der Ovulation. Der gespaltene FSH-Gipfel 5 - 3 Tage vor der Ovulation könnte für das finale Follikelwachstum nach der Luteolyse verantwortlich sein, denn er fällt mit einem präovulatorischen Östrogen-Anstieg zusammen (Mellin und Erb 1966, Wettemann et al. 1972, Glencross et al. 1973, Peterson et al. 1975). Der präovulatorische FSH-Peak fällt nicht in allen Einzelzyklen zeitlich mit dem präovulatorischen LH-Peak zusammen, teilweise ist er nur sehr schwach ausgeprägt. Dies könnte ein Hinweis auf getrennte Freisetzungsmechanismen der beiden Gonadotropine sein, was schon 1966 Robertson und Rakha während des Brunstzyklus anhand von (im biologischen Test ermittelten) FSH-Gehalten in Hypophysen vermuteten. Bei Sauen tritt ein post-ovulatorischer FSH-Peak 2 - 3 Tage nach der Brunst auf (Rayford et al. 1974), etwa zur Zyklusmitte ist eine zweite gut ausgeprägte FSH-Erhebung meßbar. Wenn beim weiblichen Tier ebenfalls ein "Inhibin" nachgewiesen werden kann, das in den Granulosa-Zellen des Ovars gebildet werden soll (De Jong und Sharpe 1976a), dann wäre die Sekretion von LH und FSH durch einen gemeinsamen "Release" besser verständlich.

Dies würde auch Versuche mit Gonadoliberin eher erklären, bei denen - nach Messungen im peripheren Blutplasma - Dosis/Wirkungsbeziehungen und Freisetzungscharakteristika für LH und FSH verschieden sind. Die FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse zeigt bei wiederholten Injektionen keine oder nur eine stark verkürzte Refraktärzeit gegenüber LH (Schams et al. 1974).

Zugleich scheint der FSH-"Release" bei weiblichen Tieren vom jeweiligen Zyklusstand abhängig zu sein, da die beste Reaktion am Tag 17 - 18 beobachtet werden konnte, eventuell bedingt durch die ansteigenden Östrogenspiegel während dieser Zyklusphase. Vielleicht können die sehr deutlichen FSH-Erhöhungen während der Brunst nach Auslösung der Superovulation auch mit einer gesteigerten Östrogen-Produktion nach Anbildung zahlreicher Follikel in Zusammenhang gebracht werden.

Die Experimente mit GnRH-Injektionen nach Gelbkörperenukulation, bei denen eine erhöhte FSH-Freisetzung gemessen werden konnte, könnten vielleicht auch mit einem rascheren Östrogenanstieg nach Wegfall der Progesteronblockade als bei physiologischer Luteolyse erklärt werden. Zusätzlich weisen die FSH-Kurven im Gegensatz zu der üblicherweise vorherrschenden stark pulsatilen Ausschüttungscharakteristik einen mehr glatten und kontinuierlichen Verlauf auf. Noch bessere FSH-Freisetzung konnte nach Injektion eines GnRH-Analogs gemessen werden, ähnlich wie es Findlay und Cumming 1976 für beide gonadotropen Hormone an weiblichen Schafen ebenfalls feststellten. Bei fast allen Tieren, die über längere Perioden während der Trächtigkeit und während der post-partum-Periode untersucht wurden, fallen etwa 14 - 18 Tage dauernde wellenartige Veränderungen in den FSH-Spiegeln mit Niveauniedrigungen gegen Trächtigkeitseende auf, wie auch Chamley et al. 1976 bei Schafen signifikanten Abfall an Hypophysen-FSH im letzten Trächtigkeitsdrittel radioimmunologisch messen konnten. Ein "Trigger" für diese Mechanismen ist nicht bekannt. Ebenfalls scheint die Geburt keinerlei Einfluß auszuüben. FSH-Konzentrationen während der Nachgeburtsphase zeigen einen weitgehend individuellen Verlauf. Ca. 10 Tage p.p. steigen die FSH-Spiegel teilweise an und weisen in den folgenden Wochen relativ konstantes Niveau auf; erst ca. 2 - 3 Monate nach der Geburt fallen zunehmend stärkere Veränderungen auf, wie sie auch während des Zyklus vorherrschend sind. Trotzdem kann aber post partum teilweise ein regelmäßiger Brunstzyklus in normalen Intervallen bei noch sehr niedrigen und konstanten FSH-Plasma-Konzentrationen anlaufen. Generell sind während dieser weitgehend individuell geprägten post-partum-Periode auch bei frühem Ingangkommen eines erneuten zyklischen Geschehens nur äußerst geringe Veränderungen im Gonadotropin-Spiegel meßbar, wie es auch für LH schon von Schams et al. 1972 beschrieben wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bestimmung von FSH aus Rinderplasma oder -serum wurde ein kreuz-reagierender Doppelantikörper-Radioimmunotest eingerichtet. Als Antigen zur Immunisierung und radioaktiven Markierung wird eine hochgereinigte Schaf-FSH-Hypophysen-Präparation verwendet, welche eine biologische Aktivität von $31 \times$ dem internationalen Referenzpräparat (NIH-FSH-S₁) aufweist. Das Anti-Schaf-FSH-Serum vom Meerschweinchen zeigt identische immunologische Kreuzreaktion mit bovinem FSH; eine Kreuzreaktion dieses Antiserums mit hypophysärem LH und TSH konnte durch geringe Zusätze dieser Hormone ausgeschaltet werden. Der Test erfüllt die geforderten Zuverlässigkeitskriterien wie Parallelität von endogenem und exogenem Hormon, gute Wiederfindung zugesetzten Hormons aus Serum- und Plasmaproben ($101,7 \pm 7,7 \%$) und gute Reproduzierbarkeit mit einer durchschnittlichen Variation der von Test zu Test mitlaufenden Kontrollproben von $11,8 \%$. Die mittlere Schwankungsbreite innerhalb des Tests liegt bei $5 - 6 \%$, die untere Nachweisgrenze reproduzierbarer Meßwerte bei 30 ± 17 ng NIH-FSH-B₁/ml. Alle Messungen sind in einem der beiden bovinen Referenzpräparate Ambinon-FSH oder NIH-FSH-B₁ ausgedrückt, wobei dieser Standard eine $3,06$ fach höhere biologische Aktivität als Ambinon-FSH aufweist. Die erstmals eingeführte enzymatische Markierungsmethode erbrachte ausreichend hohe Mengen radioaktiven FSH's, um damit innerhalb der maximalen Lagerungszeit von 10 Tagen 3 - 4 Radioimmunotests mit ca. 4000 - 5000 Teströhrchen mit einer mittleren Testbindung von 45% bei einer Antiserum-Endverdünnung von $1 : 80\,000$ durchzuführen.

Bei der biologischen Halbwertszeitbestimmung von endogenem und exogen zugeführtem FSH errechnen sich 2 Komponenten von 38 und 127 Minuten. Bei der Infusion von Steroidhormonen erhöhen geringe Gaben von Östradiol-17 β ($0,5$ mg/Stunde) die FSH-Spiegel, während höhere Dosierungen ($1 - 2$ mg/Stunde) die FSH-Sekretion während der Infusion bis 30 - 60 Minuten nach Infusionsende signifikant unterdrücken. Die Kastration eines männlichen Kalbes bewirkt starken FSH-Anstieg, die pulsartigen Schwankungen bleiben davon jedoch weitgehend unbeeinflusst.

Während der Sexualentwicklung tritt bei männlichen Tieren ein biphasischer FSH-Anstieg auf, der frühestens mit der 33. Lebenswoche beginnt; die Mittelwerte während eines Monats liegen in höherem Alter (nach der Pubertät) über denen vor der beginnenden Sexualentwicklung. Bei weiblichen Tieren können von der Geburt bis zur ersten wahrnehmbaren Brunst individuell unterschiedliche Perioden erhöhter, aber auch stark erniedrigter FSH-Aktivität gefunden werden, eventuelle pubertätsbedingte Veränderungen der Hormonspiegel werden durch die Vorgänge während des Zyklus überlagert.

Bei einer Zusammenfassung von 27 regelmäßigen Zyklen in einem Zyklus-schemata verdeutlichte sich ein wellenartiges Ansteigen der FSH-Werte in viertägigem Intervall an den Tagen 4, 8, 12, 16 und 20 des Zyklus zusätzlich zu einem auch bei den Einzeltieren meist gefundenen Peak am Tag 18, der mit der Luteolyse einhergeht. Die präovulatorischen FSH-Peaks mit einer Dauer von bis zu 36 Stunden sind nicht bei allen Tieren konstant ausgeprägt, auch müssen sie nicht mit dem prä-ovulatorischen LH-Peak zeitlich exakt zusammenfallen.

Während Trächtigkeit und post-partum-Phase laufen bei den meisten Tieren wellenartige Bewegungen in der FSH-Freisetzung mit 14- bis 18-tägigem Intervall ab, das Basalniveau sinkt bei einigen Tieren während der Gravidität ab. Spontane und corticoid-induzierte Geburten bewirken keinerlei Beeinflussung der FSH-Ausschüttung, ca. 10 Tage p.p. läßt sich bei einigen Tieren eine Tendenz ansteigender Basiswerte erkennen.

Episodische FSH-Freisetzungen konnten bei männlichen und weiblichen Tieren jeden Alters beobachtet werden, dabei treten 2 Grundtypen auf, kurzzeitige bis 30-minütige "Spikes" und bis zu 75-minütige Erhebungen, die diese "Spikes" bis um das Doppelte überragen können. Die individuell unterschiedlich häufigen FSH-Freisetzungen können keinerlei äußeren Beeinflussungen zugeordnet werden und unterliegen keinerlei Periodizität.

Intravenöse und intramuskuläre Injektionen von Gonadoliberin (Dekapeptid) konnten bei männlichen und weiblichen Tieren jeden Alters FSH-Erhöhungen bewirken. Nach intramuskulärer Injektion von 15 bis 3000 µg GnRH wurden FSH-Freisetzungen beobachtet, jedoch liegt das

Wirkoptimum bei 500 µg, wobei bis zu 4 Stunden andauernde FSH-Erhöhungen provoziert werden können. Bei Injektionen während verschiedener Zyklusphasen kann die beste Reaktionslage am 17. - 18. Zyklastag festgestellt werden, wird Gonadoliberin nach Enukleation des Gelbkörpers während des Zyklus injiziert, so wird eine sehr gute FSH-Freisetzung ausgelöst, die oft doppelt so hoch liegt wie bei vergleichbaren Experimenten in der Lutealphase oder bei Bullen.

Starke individuelle Variationen können während der post-partum-Phase nach GnRH-Verabreichung beobachtet werden, wobei Tiere oft nach nur kurzzeitigen nicht deutlich ausgeprägten FSH-Erhöhungen Follikelwachstum und Ovulation, aber auch Zystenbildungen am Ovar zeigten. Weibliche Kälber reagieren nach GnRH-Behandlung bezüglich Gipfelhöhe und Gesamtfreisetzung hochsignifikant schlechter als männliche.

Intramuskuläre Injektion eines Gonadoliberin-Analogs (Nonapeptid) kann während der Lutealphase des Zyklus für etwa 300 Minuten Dauer FSH-Ausschüttungen auslösen, die erst mit 25-fach höherer Dosis der GnRH-Originalsubstanz erreicht werden können. Intravenöse TRH-Gaben können teilweise kurzdauernde geringgradige FSH-Freisetzungen auslösen.

Nach PMSG-Injektionen in Kombination mit 48 Stunden später appliziertem Prostaglandin-Analog ICI 80 996 traten während der provozierten Brunst, die 39 - 63 Stunden nach der Einleitung einer Luteolyse einsetzte, sehr deutliche FSH-Erhöhungen auf. Eine unmittelbare FSH-Beeinflussung durch Prostaglandin-Analog-Injektionen, sowie auch durch Applikation eines Prolaktin-Inhibitors 2-Br- α -Ergokryptin-Methansulfonat konnte nicht festgestellt werden.

SUMMARY

For determination of FSH from bovine plasma or serum a crossreacting radioimmunoassay has been developed. For immunization and radioiodination a highly purified ovine FSH-pituitary preparation was used having a biological activity of 31 times the international reference standard NIH-FSH-S₁. The anti-ovine-FSH-serum raised in a guinea pig showed identical immunological cross-reaction with bovine FSH; slight cross-reaction with TSH and LH could be eliminated by addition of cold hormone to the antiserum. The assay complies with the criteria of reliability: inhibition curves obtained with male and female bovine plasma were parallel to those obtained with the bovine standard preparation; exogenous FSH could be quantitatively recovered from plasma or serum with a mean of 101.7 ± 7.7 %; the inter-assay coefficient of variation (reproducibility of control samples run in every assay) was 11.8 %, the intra-assay coefficient of variation was 5 - 6 %, the lower limit of reproducible values was 30 ± 17 ng NIH-FSH-B₁/ml. All values are expressed either in Ambinon-FSH or in NIH-FSH-B₁-standard, the last one having a 3.06 times higher biological activity. The labelling method with lactoperoxidase turned out to yield a sufficiently high amount of radio-iodinated FSH for 3 - 4 radioimmunoassays (with about 4000 - 5000 tubes) carried out within a maximal storage time of the labelled hormone of 10 days resulting in an average assay binding of 45 % at a final antiserum-dilution of 1 : 80 000.

The biological half-span of endogenous and exogenous administered FSH turned out to consist of two compounds of 38 and 127 minutes. Low doses of oestradiol-17 β (0.5 mg/hour) increase FSH-levels whereas higher doses (1 - 2 mg/hour) significantly depress FSH-secretion during the infusion and up to 30 - 60 minutes after it. Orchidectomy of a calf provokes intensive FSH increase but is of no influence worth mentioning on pulsatile FSH-secretion variations.

During sexual maturation a biphasic FSH-rise occurred in male animals the earliest beginning of which was observed at an age of 33 weeks; monthly mean values at a higher age (after puberty) significantly exceed

those before the beginning of sexual development. In female animals from birth up to the first detectable oestrus there are noticeable individually different periods of high but also of very low FSH activity; perhaps puberal changes of the hormonal levels are superimposed by cyclical processes.

When data of 27 regular cycles of heifers and cows are summarized a wavelike rhythmic FSH-secretion pattern with 4 day intervals is visible with peaks on days 4, 8, 12, 16, 20 and an additional one on day 18 coinciding with luteolysis; this last one can almost regularly be found in individual cycles. The preovulatory FSH-peaks lasting up to 36 hours are not constantly marked in all animals and do not always coincide with the preovulatory LH-peak.

During pregnancy and postpartum period wavelike FSH-secretion patterns with 14 to 18 day intervals occur; in some animals basal values decrease during pregnancy. There is no influence of physiological and corticoid-induced parturition on the FSH-secretion, in some cows there is a beginning rise of FSH levels about 10 days postpartum. In male and female cattle of all ages there could be measured episodic FSH-variations showing two different types, a first one with brief spikes having a maximal duration of 30 minutes and a second one with peaks exceeding these spikes twice and lasting up to 75 minutes; the individually different frequency of episodic FSH peaks cannot be correlated with external influences and seems to be not subjected to any periodicity.

After intravenous or intramuscular injection of gonadoliberein (decapeptide) there is FSH response in male and female bovines at every age; intramuscular injection of 15 - 3000 μ g GnRH may provoke dose-depending FSH release; maximal reaction with a duration of enhanced values of about 4 hours seems to happen with 500 μ g. The effect of GnRH on plasma levels of FSH at various stages of the oestrous cycle shows a tendency for an increasing response on days 17 - 18. After enucleation of the corpus luteum during the oestrous cycle FSH response after gonadoliberein injection could be evaluated often twice as high as in comparable experiments during the luteal phase in females or even in bulls. Marked individual variations are

noticeable after GnRH treatment during the postpartum period: following often only brief and not distinct FSH response in some animals follicular growth and ovulation, in some others cystic ovaries occur. Following GnRH-injections female calves showed a significantly less pronounced FSH response concerning peak levels and the total of released hormone than male ones.

Intramuscular injection of a gonadoliberein-analogue (nonapeptide) during the luteal phase of oestrous cycle can provoke increased FSH values with a duration of about 300 minutes comparable to FSH response with a 25 times higher dose of GnRH decapeptide. Short FSH-elevations could be measured only after intravenous injections of TRH. After administration of PMSG in combination with a prostaglandin analogue (ICI 80 996) given 48 hours later a distinct FSH-peak rose 39 - 63 hours after induction of luteolysis. Direct influences of prostaglandin-analogue and of prolactin-inhibitor 2-Br- α -ergocryptin-methansulfonate on FSH-levels have not been observed.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Akbar A.M., Reichert L.E. Jr., Dunn T.G., Kaltenbach C.C. und Niswender G.D. (1974)

Serum levels of follicle-stimulating hormone during the bovine estrous cycle

J. Anim. Sci. 39, 360 - 365

Allen E. (1922)

The oestrous cycle of the mouse

Amer. J. Anat. 30, 297 - 372

Allen E. und Doisy E.A. (1923)

An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals

J. Amer. Med. Ass. 81, 819

Arimura A., Debeljuk L. und Schally A.V. (1972)

Stimulation of FSH release in vivo by prolonged infusion of synthetic LH-RH

Endocrinology 91, 529 - 532

Arimura A., Vilchez-Martinez J.A., Coy D.H., Coy E.J., Hirotsu Y. und Schally A.V. (1974)

(D-Ala⁶, des-Gly-NH₂¹⁰)-LH-RH-ethylamide: a new analogue with unusually high LH-RH/FSH-RH activity

Endocrinology 95, 1174 - 1177

Aschheim S. und Zondek B. (1927)

Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren

Klin. Wschr. 6, 1322

Aschheim S. und Zondek B. (1928 a)

Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn (durch Hormon-
nachweis)

Klin. Wschr. 7, 8 - 9

Aschheim S. und Zondek B. (1928 b)

Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch Nachweis des
Hypophysenvorderlappenhormons

I. Grundlage und Technik der Methode

Klin. Wschr. 7, 1404 - 1411

Aschheim S. und Zondek B. (1928 c)

Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch Nachweis des
Hypophysenvorderlappenhormons

II. Praktische und theoretische Ergebnisse aus den Harn-
untersuchungen

Klin. Wschr. 7, 1453 - 1457

Baba Y., Matsuo H. und Schally A.V. (1971)

Structure of the porcine LH- and FSH-releasing-hormone

II. Confirmation of the proposed structure by conventional
sequential analysis

Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 459 - 463

Bailly du Bois M., Kerdelhué B. und Jutisz M. (1970)

Dosage radioimmunologique de l'hormone FSH d'origine ovine

C. R. Acad. Sci., Série D (Paris) 271, 1556 - 1559

Barraclough C.A. (1966)

Modifications in the CNS regulation of reproduction after
exposure of prepubertal rats to steroid hormones

Rec. Progr. Horm. Res. 22, 503 - 539

Bates R.W., Riddle O. und Lahr E.L. (1935)

An assay of three hormones present in anterior pituitaries of seven types of cattle classified for age, sex and stage of reproduction

Amer. J. Physiol. 113, 259 - 264

Bates R.W. und Schooley J.P. (1942)

Studies on the assay of pituitary gonadotropins using the augmentation reaction

Endocrinology 31, 309 - 317

Batta S.K., Zanisi M. und Martini L. (1974)

Prostaglandins and gonadotropin secretion

Neuroendocrinology 14, 224 - 232

Bayliss W.M. und Starling E.H. (1902)

The mechanism of pancreatic secretion

J. Physiol. 28, 325 - 353

Bentele W. und Humke R. (1976)

Versuch zur Behandlung des verzögerten Follikelsprungs beim Rind mit dem synthetischen LH-FSH-Releasing-Hormon

Tierärztl. Umschau 31, 218 - 224

Berson S.A. und Yalow R.S. (1968)

General principles of radioimmunoassay

Clin. Chim. Acta 22, 51 - 69

Berson S.A. und Yalow R.S. (Hrsg.) (1973)

Methods in investigative and diagnostic endocrinology

Vol. 2 A, Peptide hormones

North Holland Publishing Co.

Amsterdam, London, New York

Berthold A.A. (1849)

Transplantation der Hoden

Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt. 42 - 46

Leipzig

Besser G.M., McNeilly A.S., Anderson D.C., Marshall J.C., Harsoulis P.,

Hall R., Ormston B. J., Alexander L. und Collins W.P. (1972)

Hormonal responses to synthetic luteinizing hormone- and

follicle stimulating hormone-releasing hormone in man

Brit. Med. J. 3, 267 - 271

Besser G.M. und Mortimer C.H. (1974)

Hypothalamic regulatory hormones: a review

J. Clin. Path. 27, 173 - 184

Bettendorff G., Breckwoldt M., Czygan P.J., Fock A. und

Kumsaaka T. (1968)

Fractionation of human pituitary gonadotropins (extraction,
gel-filtration and electrofocusing)

In: Rosenberg E. (Hrsg.)

Gonadotropins, 13 - 23

Geron-X, Los Altos, Calif., U.S.A.

Bickel M., Kuhl A., Tan J.S.E. und Taubert H.-D. (1972)

Evidence of a sex-specific effect of testosterone and

progesterone upon L-cystine-aminopeptidase activity in the
hypothalamus and paleopallium of the rat

Neuroendocrinology 9, 321 - 331

Bierschwal C.J., Garverick H.A., Martin C.E., Youngquist R.S.,

Cantley P.C. und Brown M.D. (1975)

Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH

J. Anim. Sci. 41, 1660 - 1665

Bogdanove E.M., Campbell G.T., Blair E.D., Mula M.E., Miller A.E.
und Grossman G.H. (1974)

Gonad-pituitary feedback involves qualitative change:
androgens alter the type of FSH secreted by the rat pituitary
Endocrinology 95, 219 - 228

Bogdanove E.M., Nolin J.M. und Campbell G.T. (1975)

Qualitative and quantitative gonad-pituitary feedback
(Proc. of Laurentian Hormone Conference 1974)
Rec. Progr. Horm. Res. 31, 567 - 626

Böler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C.Y. und Schally A.V.
(1969)

The identity of chemical and hormonal properties of the
thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-
proline amide
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 705 - 710

Bowers C.Y., Currie B.L., Gunnar Johansson K.N. und Folkers K.
(1973)

Biological evidence that separate hypothalamic hormones
release the follicle stimulating and luteinizing hormone
Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 20 - 26

Braselton W.E. Jr. und McShan W.H. (1970)

Purification and properties of follicle stimulating and
luteinizing hormones from horse pituitary glands
Arch. Biochem. Biophys. 139, 45 - 58

Britt J.H., Kittok R.J. und Harrison D.S. (1974)

Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early
postpartum cows
J. Anim. Sci. 39, 915 - 919

Buch N.C., Tyler W.J. und Casida L.E. (1955)

Postpartum estrus and involution of the uterus in an
experimental herd of Holstein-Friesian cows
J. Dairy Sci. 38, 73 - 79

Burger H.G., Baker H.W.G., Hudson B. und Taft H.P. (1972)

Gonadotropic and gonadal function in the normal adult male
In: Saxena B.B., Belling C.C. und Gandy H.M. (Hrsg.)
Gonadotrophins, 569 - 592
Wiley Interscience, New York

Butt R. (1973)

Bioassay - FSH
In: Berson S.A. und Yalow R.S. (Hrsg.)
Methods in investigative and diagnostic endocrinology,
part 2 A, 514 - 518
North Holland Publishing Comp., Amsterdam, London, New York

Cahill C.L., Shetlar U.R., Payne R.W., Endecott B. und Yu-The Li
(1968)

Isolation and characterization of ovine follicle-stimulating-
hormone
Biochim. Biophys. Acta 154, 40 - 52

Cantley P.C., Garverick H.A., Bierschwal C.J., Martin C.E. und
Youngquist R.S. (1975)

Hormonal responses of dairy cows with ovarian cysts to GnRH
J. Anim. Sci. 41, 1666 - 1673

Carreau S. und Drosdowsky M.A. (1976)

Demonstration of an androgen binding protein (ABP) in ram
testis and epididymis
Proc. V Int. Congr. of Endocrinology, Hamburg, 212

Casida L.E. (1976)

Ovulation studies with particular reference to the pig
(The seventh annual Carl G. Hartman Lecture)
Biol. Reprod. 14, 97 - 107

Catt K.J., Dufau M.L., Neaves W.B., Walsh P.C. und Wilson J.D.
(1975)

LH-hCG receptors and testosterone content during
differentiation of the testis in the rabbit embryo
Endocrinology 97, 1157 - 1165

Chamley W.A., Jonas H.A. und Parr R.A. (1976)

Content of LH, FSH, and growth hormone in the pituitaries
of pregnant and anestrus sheep
Endocrinology 98, 1535 - 1538

Chance M.R.A., Rowlands J.W. und Young F.G. (1939)

Specific variation in thyrotrophic, gonadotrophic, and
prolactin activities of the anterior hypophyseal tissue
J. Endocr. 1, 239 - 260

Channing C.P. (1974)

Temporal effect of LH, hCG, FSH and dibutyryl cyclic 3',5'-
AMP upon luteinization of Rhesus monkey granulosa cells in
culture
Endocrinology 94, 1215 - 1223

Channing C.P. und Kammerman S. (1974)

Binding of gonadotropins to ovarian cells
Biol. Reprod. 10, 179 - 198

Channing C.P. (1975)

Follicle stimulating hormone stimulation of ^{125}I -human chorionic
gonadotropin binding in porcine granulosa cell cultures
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 149, 238 - 241

Chappel S.C. und Barraclough C.A. (1976)

Hypothalamic regulation of pituitary FSH secretion
Endocrinology 98, 927 - 935

Christiansen P. (1972 a)

Studies on the rat ovarian augmentation method for follicle
stimulating hormone
Acta endocr. (Kbh.) 70, 636 - 646

Christiansen P. (1972 b)

The rat ovarian augmentation method for follicle stimulating
hormone. Specificity of the test.
Acta endocr. (Kbh.) 70, 647 - 653

Claus R. (1972)

Fortpflanzung bei männlichen und weiblichen Haustieren
In: Lenkeit W. und Breirem K. (Hrsg.)
Handbuch der Tierernährung, Band 2, Leistung und Ernährung,
55 - 102
Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin

Convey E.M. (1973)

Neuroendocrine relationships in farm animals: a review
J. Anim. Sci. 37, 745 - 757

Cooper M.J., Dobson H. und Furr B.J.A. (1974)

Endocrine changes in Friesian heifers during luteolysis and
oestrous synchronization with ICI 80 996, a synthetic
analogue of prostaglandin $F_{2\alpha}$
J. Steroid Biochem. 5, 403

Coudert S.P., Phillips G.D., Faïman C., Chernecki W. und Palmer M.
(1974 a)

A study of the utero-ovarian circulation in sheep with reference
to local transfer between venous and arterial blood
J. Reprod. Fert. 36, 319 - 331

Coudert S.P., Phillips G.D., Faïman C., Chérnecki W. und Palmer M.
(1974 b)

Infusion of tritiated prostaglandin $F_{2\alpha}$ into the anterior
uterine vein of the ewe: absence of local venous arterial
transfer

J. Reprod. Fert. 36, 333 - 343

Courot M. (1970)

Effect of gonadotropins on the seminiferous tubules of the
immature testis

In: Rosenberg E. und Paulsen C.A. (Hrsg.)

The human testis, 355 - 367

Plenum Press, New York, London

Coy D.H., Coy E.J., Schally A.V., Vilchez-Martínez J.A., Debeljuk L.,
Carter W.H. und Arimura A. (1974)

Stimulatory and inhibitory analogs of luteinizing hormone
releasing hormone

Biochemistry 13, 323 - 326

Craig G.M. (1975)

The effect of intravenous prostaglandin $F_{2\alpha}$ on serum
luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and plasma
cortisol in normal men

J. Clin. Endocr. Metab. 41, 180 - 182

Cumming I.A., Baxter R.W., Buckmaster J.M., Jonas H.A., Findlay J.K.
und Goding J.R. (1973)

Control of FSH secretion in the ewe

J. Reprod. Fert. 36, 447 - 448

Cumming I.A. (1975)

The ovine and bovine oestrous cycle

(An appreciation of J. R. Goding's contribution to the under-
standing of the oestrous cycle)

J. Reprod. Fert. 43, 583 - 596

- Cummins L.J., Blockey M.A.D., Brown J.M. und Goding J.R. (1972)
A study of luteinizing hormone secretion in the cow
J. Reprod. Fert. 28, 135 - 136
- Cunningham N.F. und Hebert C.N. (1973)
A solid-phase radioimmunoassay for ovine follicle-stimulating hormone
J. Endocr. 58, 239 - 249
- Currie B.L., Gunnar Johansson K.N. und Folkers K. (1973)
On the chemical existence and partial purification of the hypothalamic follicle stimulating hormone releasing hormone
Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 14 - 19
- Cushing H., Crowe S.J. und Homans J. (1910)
Experimental hypophysectomy
Johns Hopk. Hosp. Bull 21, 127 - 169
- Davidson J.M. und Bloch G.J. (1969)
Neuroendocrine aspects of male reproduction
Biol. Reprod. 1, 67 - 92
- Dérivaux J., Ectors F., Hendrick J.C. und Franchimont P. (1974)
Détermination de la FSH plasmatique chez les bovins
Ann. Endocr. (Paris) 35, 614 - 621
- Dérivaux J., Ectors F. und Beckers J.F. (1976)
Hormonelle Befunde bei Störungen der Ovarialfunktion des Rindes
25. Tagung für Fortpflanzung und künstliche Besamung
30. Sept. - 2. Okt., Wels, Österreich
Dtsch. tierärztl. Wschr. 83, 561 - 563
- Dermody W.C., Reel J.R., Beck C.C. und Coppock R.W. (1976)
Serum luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after intravenous and intrauterine administration of luteinizing hormone-releasing hormone
Vet. Med./Small Anim. Clin. 71, 419 - 422

Desjardins C. und Hafs H.D. (1968)

Levels of pituitary FSH and LH in heifers from birth through puberty

J. Anim. Sci. 27, 472 - 477

Dhariwal A.P.S., Nallar R., Batt M. und McCann S.M. (1965)

Separation of follicle-stimulating hormone-releasing factor from luteinizing hormone-releasing factor

Endocrinology 76, 290 - 294

Dobson H., Cooper M.J. und Furr B.J.A. (1975)

Synchronization of oestrus with ICI 79939, an analogue of $PgF_{2\alpha}$, and associated changes in plasma progesterone, oestradiol-17 β and LH in heifers

J. Reprod. Fert. 42, 141 - 144

Döcke F. (1975)

Veterinärmedizinische Endokrinologie

Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Donovan B.T. und van der Werft ten Bosch J.J. (1965)

Physiology of puberty

Edward Arnold Publishers Ltd., London

Ekblad M., Bewley T.A. und Pakkoff H. (1970)

Circular dichroism studies on ovine follicle stimulating hormone

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 221, 142 - 145

Endocrine Society (1975)

The nomenclature of peptide hormones, IUPAC-IUB commission on biochemical nomenclature recommendations

Endocrinology 97, 1606 - 1607

Evans H.M. und Simpson M.E. (1929)

The effect of pregnancy on the anterior hypophysis of the rat and cow as judged by the capacity of implants to produce precocious maturity

Amer. J. Physiol. 89, 379 - 380

Evans H.M., Meyer K., Simpson M.E. et al. (1933): Zit. nach Nalbandov A. und Casida L.E. (1940)

Gonadotrophic action of pituitaries from pregnant cows
Endocrinology 27, 559 - 566

Faiman C. und Ryan R.J. (1967)

Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone
J. Clin. Endocr. Metab. 27, 444 - 447

Faiman C., Ryan R.J., Zwirek S.J. und Rubin M.E. (1968)

Serum FSH and HCG during pregnancy and puerperium
J. Clin. Endocr. Metab. 28, 1323 - 1328

Faiman C. und Ryan R.J. (1969)

Mechanism of specificity in radioimmunoassay for human FSH after HCG adsorption of antisera
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 132, 691 - 695

Faiman C. und Winter J.S.D. (1971)

Diurnal cycles in plasma FSH, testosterone and cortisol in man
J. Clin. Endocr. 33, 186 - 192

Findlay J.K. und Cumming I.A. (1976)

Increases in ovulation rate in sheep following administration of an LHRH analogue
Biol. Reprod. 15, 115 - 117

Fevold H.L., Hisaw F.L. und Leonhard S.L. (1930)

The gonad-stimulating and the luteinizing hormones of the
anterior lobe of the hypophysis
Anat.Rec. 47, 299

Flückiger E. und Wagner H.R. (1968)

2-Br-~~O~~-Ergokryptin: Beeinflussung von Fertilität und
Laktation bei der Ratte
Experientia 24, 1130 - 1131

Foster D.L., Lemons J.A., Jaffe R.B. und Niswender G.D. (1975 a)

Sequential patterns of circulating luteinizing hormone and
follicle-stimulating hormone in female sheep from early
postnatal life through the first estrous cycle
Endocrinology 97, 985 - 994

Foster D.L., Jaffe R.B. und Niswender G.D. (1975 b)

Sequential patterns of circulating LH and FSH in female
sheep during early postnatal period: effect of gonadectomy
Endocrinology 96, 15 - 22

Fontaine Y.A. (1969)

La spécificité zoologique des protéines hypophysaires capables
de stimuler la thyroïde
Acta endocr. (Kbh.) 60, Suppl. 136, 1 - 154

Fraenkel L. (1903)

Die Funktion des Corpus luteum
Arch. Gynäk. (Berlin) 68, 438 - 545

Franchimont P. und Chari S. (1974)

Control of gonadotrophin secretion in man
Symposia abstract book 4th Int. Congr. Hormonal Steroids,
Mexico City, September 2 - 7, S-34 (3)

- Franchimont P., Chari S. und Demoulin A. (1975)
Hypothalamus-pituitary-testis interaction
J. Reprod. Fert. 44, 335 - 350
- Frantz W.L. und Turkington R.W. (1972)
Formation of biologically active ^{125}I -prolactine by enzymatic radioiodination
Endocrinology 91, 1545 - 1548
- Frowein J., Engel W. und Weise H.C. (1973)
HCG-receptor present in the gonadotrophin insensitive Leydig cell of the immature rat
Nature New Biology 246, 148 - 150
- Galloway D.G. und Palletier J. (1974)
Influence of age on the pituitary response of male lambs to synthetic LH-RH injection
Horm. Metab. Res. 6, 240 - 241
- Ganong W.F. (1959)
In: Cole H. und Cupps P.T. (Hrsg.)
Reproduction in domestic animals, Vol. I, 185 - 217
Academic Press New York
- Gay V.L., Midgley A.R. Jr. und Niswender G.D. (1970)
Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation
Fed. Proc. 29, 1880 - 1887
- Gay V.L. (1974)
Decreased metabolism and increased serum concentrations of LH and FSH following nephrectomy of the rat: absence of short-loop regulatory mechanisms
Endocrinology 95, 1582 - 1588
- Geigy J.R. (Hrsg.) (1968)
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage
Documenta Geigy, Basel

Geiger R., König W., Wissmann H., Geisen H. und Enzmann F.
(1971)

Synthesis and characterization of a decapeptide having
LH-RH, FSH-RH activity
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 767 - 773

Giménez T., Schams D., Schallenger E. und Hoffmann B. (1974 a)
Androgene und Gonadotropinkonzentrationen im peripheren Blut
von männlichen Rindern von der Geburt bis zur Pubertät
Zuchthyg. 9, 3

Giménez T., Hoffmann B., Schams D., Hartl M., Schallenger E.
und Karg H. (1974 b)
Plasma levels of testosterone in relation to LH and FSH in
bulls from birth through puberty
J. Steroid Biochem. 5, 383 - 384

Giménez T. (1975)
Radioimmunologische Androgenbestimmungen im Blutplasma von
Rind und Rehwild
Diss. med.vet., München

Glencross R.G., Munro I.B., Senior B.E. und Pope G.S. (1973)
Concentrations of oestradiol-17 β , oestrone and progesterone in
jugular venous plasma of cows during the oestrous cycle and in
early pregnancy
Acta endocr. (Kbh.) 73, 374 - 384

Godden P.M.M., Scanes C.G. und Sharp P.J. (1975)
Variations in the levels of follicle-stimulating hormone in the
circulation of birds, as determined by homologous radioimmunoassay
J. Endocr. 67, 20p - 21p

Golter T.D., Reeves J.J., O'Mary C.C., Arimura A. und Schally A.V. (1973)
Serum levels in bulls treated with synthetic luteinizing hormone-
releasing hormone/follicle stimulating hormone-releasing hormone
(LH-RH/FSH-RH)
J. Anim. Sci. 37, 123 - 127

Gorski R.A. (1971)

Gonadal hormones and the perinatal development of neuroendocrine function

In: Martini L. und Ganong W.F. (Hrsg.)

Frontiers in neuroendocrinology, 237 - 290

Oxford University Press, New York, London, Toronto

Govan A.D.T. (1970)

Ovarian follicular activity in late pregnancy

J. Endocr. 48, 235 - 241

Gottschalk A., Whitten W.K. und Graham E.R.B. (1960)

Inactivation of follicle-stimulating-hormone by enzymatic release of sialic acid

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 38, 183 - 184

Greenwood F.C., Hunter W.M. und Glover J.S. (1963)

The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity

Biochem. J. 89, 114 - 123

Greep R.O., van Dyke H.B. und Chow B.F. (1941)

Use of anterior lobe of prostate gland in assay of metakentrin

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 46, 644 - 649

Greep R.O., van Dyke H.B. und Chow B.F. (1942)

Gonadotropins of swine pituitary

I. Various biological effects of purified thylenkentrin (FSH) and pure metakentrin (ICSH)

Endocrinology 30, 635 - 649

Gunnar Johansson K.N., Currie B.L., Folkers K. und Bowers C.Y. (1973)

Biosynthesis and evidence for the existence of the follicle stimulating hormone releasing hormone

Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 8 - 13

Grunert E., Hoffmann B. und Ahlers D. (1974)

Klinische und hormonanalytische Untersuchungen bei Kühen mit
Ovarialzysten vor und nach Gonadotropin-Releasinghormon(Gn-RH-)
-Verabreichung

Dtsch. tierärztl. Wschr. 81, 386 - 388

Hansel W. und Schechter R.E. (1972)

Biotechnical procedures for control of the estrous cycles of
domestic animals

Proc. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.

München, Band I, 78 - 96

Hafs H. (1974)

Hormonal relationships in the bovine male from birth to
puberty

Seminar: Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik der
Universität München, 9. 5. 1974

Hansson V., French F.S., Weddington S.C., McLean W.S., Tindall D.J.,
Smith A.A. und Nayfeh S.N. (1973 a)

Androgen transport mechanisms in the testis and epididymis
Int. Res. Comm. Syst. (73- 11) 3-10-33

Hansson V., Reusch E., Trygstad O. und Torgersen O. (1973 b)

FSH stimulation of testicular androgen binding protein.
Nature, New Biology 246, 56 - 58

Hansson V., Trygstad O., French F.S., McLean W.S., Smith A.A.,
Tindall D.J., Weddington S.C., Petrusz P., Nayfeh S.N. und
Ritzén E.M. (1974)

Androgen transport and receptor mechanisms in testis and
epididymis

Nature (Lond.) 250, 387 - 391

Harms P.G., Ojeda S.R. und McCann S.M. (1974)

Prostaglandin - induced release of pituitary gonadotrophins:
central nervous system and pituitary sites of action
Endocrinology 94, 1459 - 1464

Hartl M. (1974)

Versuche zur Freisetzung von Luteinisierungshormon mit einem
synthetischen Releasinghormon sowie zur Wirkung von
Prostaglandinen auf die Zyklussteuerung beim Rind
Diss. med. vet., München

Hashimoto C., McShan W.H. und Meyer R.K. (1965)

Preparation of follicle stimulating hormone from sheep pituitary
glands
Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 120 - 125

Hausler C.L. und Malven P.V. (1976)

Interaction of progesterone, GnRH and estradiol in the control
of LH release in castrated heifers
J. Anim. Sci. 42, 1239 - 1243

Hendrick J.C., Legros J.J. und Franchimont P. (1971)

Le dosage radioimmunologique de la réaction croisée entre la
FSH de rat, de mouton et de porc
Ann. Endocr. (Paris) 32, 241 - 251

Hendrick J.C. und Franchimont P. (1973)

Cross-reaction between FSH from different species
In: Kirkham K.E. und Hunter W.M. (Hrsg.)
Radioimmunoassay methods, 158 - 160
Churchill Livingstone, Edinburgh - London

Henricks D.M., Dickey J.F. und Niswander G.D. (1970)

Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during
the estrous cycle and early pregnancy in cows
Biol. Reprod. 2, 346 - 351

- Henricks D.M., Dickey J.P. und Hill J.R. Jr. (1971)
Plasma estrogene and progesterone levels in cows prior to and during estrus
Endocrinology 89, 1350 - 1355
- Henricks D.M. und Lamond D.R. (1972)
Hormonal interrelations in beef cows with induced multiple ovulations
Nature 235, 222 - 223
- Henricks D.M., Hill J.R. Jr., Dickey J.F. und Lamond D.R. (1973)
Plasma hormone levels in beef cows with induced multiple ovulations
J. Reprod. Fert. 35, 225 - 233
- Hill R.T. (1934)
Species variation in the gonadotropic activity of the hypophysis
J. Physiol. 83, 137 - 144
- Himmler V. (1977)
Versuche zur radioimmunologischen Bestimmung von Ocytocin im Rinderplasma
Diss. med. vet., München
- Höfer F. (1973)
Wirkung eines synthetischen LH/FSH-Releasinghormons auf die Freisetzung des Luteinisierungshormons und auf die Ovarfunktion beim Rind
Diss. med. vet., München
- Hoffmann B. (1972)
Die Bestimmung von Östrogenen
In: Kaiser E. (Hrsg.)
Fortschritte der klinischen Chemie: Enzyme und Hormone, 491 - 500
Verlag der Wiener Medizinischen Akademie

Hoffmann B., Kyrein H.J. und Ender M.-L. (1973)

An efficient procedure for the determination of progesterone
by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma
Hormone Res. 4, 302 - 310

Hoffmann B., Grunert E. und Seeger K. (1975)

Indications for the use of synthetic hypothalamus hormones in
animal production and veterinary medicine
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 193, 166 - 167

Hohlweg W. und Dohrn M. (1931)

Beziehungen zwischen Hypophysenvorderlappen und Keimdrüsen
Wiener Archiv f. Innere Medizin 21, 337 - 350

Hohlweg W. und Junkmann K. (1932)

Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des
Hypophysenvorderlappens
Klin. Wschr. 11, 321 - 323

Hohlweg W. und Reiffenstuhl G. (1965)

Langzeitbehandlung mit Hormonen in der Gynäkologie
Wien. klin. Wschr. 77, 876 - 884

Holohan K.N., Murphey R.F., Buchanan K.D. und Elmore D.P. (1973)

Enzymic iodination of polypeptide hormones for radioimmunoassay
Clin. Chim. Acta 45, 153 - 157

Hopkinson C.R.N., Pant H.C. und Fitzpatrick R.J. (1974)

Release of LH and FSH in the normal intact ram by synthetic
LH-RF and the effect of pretreatment with testosterone
propionate
J. Reprod. Fert. 39, 135 - 139

Hunter W.M. (1970)

Standardization of the chloramine-T method of protein
iodination

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 133, 989 - 992

Hunter W.M. (1974)

Preparation and assessment of radioactive tracers

Brit. Med. Bull. 30, 18 - 23

Imai K. und Nalbandov A.V. (1971)

Changes in FSH activity of anterior pituitary glands and of
blood plasma during the laying cycle of the hen

Endocrinology 88, 1465 - 1470

International Atomic Energy Agency (1970)

In vitro procedures with radioisotopes in medicine

(Proc. Symp. Vienna, 1969)

IAEA Vienna, 1970

International Atomic Energy Agency (1974)

Radioimmunoassay and related procedures in medicine

(Proc. Symp. Istanbul, 1973, 2 Bände)

IAEA, Vienna, 1974

International Atomic Energy Agency (1976)

Nuclear techniques in animal production and health

(Proc. Symp. Vienna, 1976)

IAEA Vienna, 1976

Jeffcoate S.L. (1973)

Purification of ^{125}I -LH and ^{125}I -FSH by cellulose adsorption
chromatography

In: Kirkham K.E. und Hunter W.M. (Hrsg.)

Radioimmunoassay methods, 30 - 37

Churchill Livingstone, Edinburgh - London

Johnson D.C. und Naqvi R.H. (1969)

Effect of exogenous androgen on the Steelman-Pohley assay for follicle stimulating hormone

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 130, 1113 - 1116

Johnson D.C. und Naqvi R.H. (1970)

A simplified augmented ovarian weight assay for follicle-stimulating hormone

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 133, 536 - 539

Johnson D.C. und Mallampati R.S. (1973)

Ovarian weight changes in immature female rats as a function of dose and exposure time to PMS

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 143, 59 - 62

Jong F.H. de und Sharpe R.M. (1976 a)

Evidence for an inhibin-like activity in bovine follicular fluid

Nature 263, 71 - 72

Jong F.H. de und Sharpe R.M. (1976 b)

The Sertoli cell as a possible source of inhibin

Proc. V Int. Congr. of Endocrinology, Hamburg, 211

Kaltenbach C.C., Dunn T.G., Kiser T.E., Corah L.R. und Akbar A.M. (1973)

Gn-RH induced release of FSH and LH in heifers

J. Anim. Sci. 37, 317 - 318

Kaltenbach C.C., Dunn T.G., Kiser T.E., Corah L.R., Akbar A.M. und Niswender G.D. (1974)

Release of FSH and LH in beef heifers by synthetic gonadotrophin releasing hormone

J. Anim. Sci. 38, 357 - 362

Kamberi J.A., Schneider H.P.G. und McCann S.M. (1970)

Action of dopamin to induce release of FSH-releasing factor
(FRF) from hypothalamic tissue in vitro
Endocrinology 86, 278 - 284

Karg H. (1966 a)

Neuroendokrine Regulation der Fruchtbarkeit
Bayer. Landw. Jahrbuch 43, 733 - 749

Karg H. (1966 b)

Fütterung und Fruchtbarkeit des weiblichen Rindes
Züchtungskunde 38, 400 - 412

Karg H. und Schams D. (1968)

Attempts to determine LH in bovine blood
In: Margoulies M. (Hrsg.)
Proc. Int. Symp. "Protein and polypeptide hormones",
Liège, Mai 1968
Int. Congr. Series (ICS) 161, part 2, 415 - 418
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam

Karg H. (1970)

Endokrine Regelkreise der Fortpflanzung und deren willkürliche
Steuerung
Ztschr. Tierzücht. Züchtungsbiol. 84, 262

Karg H. und Schams D. (1974)

Prolactin release in cattle
J. Reprod. Fert. 39, 463 - 472

Karg H., Giménez T., Hartl M., Hoffmann B., Schallenberger E. und
Schams D. (1976 a)

Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating
hormone (FSH) in peripheral plasma of bulls: levels from birth
through puberty and short term variations
Zbl. Vet. Med., Reihe A, 23, 793 - 803

Karg H., Hartl M., Hoffmann B., Schams D., Schmidt W., Günzler O.,
Huber E. und Müller S. (1976 b)

Versuche mit einem Prostaglandinanalogue zur Zyklussynchronisation
beim Rind unter hormonanalytischer und klinischer Kontrolle
Zuchthyg. 11, 7 - 18

Karg H., Claus R., Hoffmann B., Schallenberg E. und Schams D.
(1976 c)

Present status and future possibilities of radioimmunoassay in
animal production
In: Nuclear techniques in animal production and health,
487 - 510
IAEA - SM - 205/109, Wien

Ketelslegers J.-M. und Catt K.J. (1974)

Receptor binding properties of ^{125}I -hFSH prepared by enzymic
iodination
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 1159 - 1162

Ketelslegers J.-M., Hsueh A.J.W., Hetzel W.D. und Catt K.J. (1976)

Induction of luteinizing hormone (LH) receptors and LH
sensitivity in the immature rat testis by follicle stimulating
hormone (FSH)
Proc. V Int. Congr. of Endocrinology, Hamburg, 212

King G.J., Hurnik J.F. und Robertson H.A. (1976)

Ovarian function and estrus in dairy cows during early
lactation
J. Anim. Sci. 42, 688 - 692

Kinder J.E., Adams Th. E., Chakraborty P.K., Tarnavsky G.K. und Reeves J.J. (1975)

Serum LH concentrations and ovarian activity in cows with repetitive administration of LH-RH/FSH-RH

J. Anim. Sci. 41, 1650 - 1652

Kinder J.E., Adams Th. E., Nett Th. M., Coy D.H., Schally A.V. und Reeves J.J. (1976)

Serum gonadotropin concentrations and ovarian response in ewes treated with analogs to LH-RH/FSH-RH

J. Anim. Sci. 42, 1220 - 1226

Kirkham K.E. und Hunter W.M. (Hrsg.) (1971)

Radioimmunoassay methods

Churchill Livingstone, Edinburgh - London

Kizer J.S., Palkovits M., Tappaz M., Kebabian J. und Brownstein M.J. (1976)

Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence

Endocrinology 98, 685 - 695

Klinefelter H.F., Albright F. und Griswold G.C. (1943)

Experience with a quantitative test for normal or decreased amounts of follicle stimulating hormone in the urine in endocrinological diagnosis

J. Clin. Endocr. 3, 529 - 544

Knobil E., Yamaji T., Peckham W.D. und Dierschke D.J. (1972)

Alterations in biological and physical properties of endogenous FSH consequent on castration

Intern. Congr. of Endocrinology, Abstract, 250

König A. und Elsaesser F. (1974)

Neuere Erkenntnisse der Endokrinologie der Fortpflanzung und
Laktation bei Haustieren

5. Folge: Endokrinologie der Sexualentwicklung

Dtsch. tierärztl. Wschr. 81, 273 - 296

Kragt C.L. und Cons J. (1973)

Radioimmunoassay of ovine FSH

J. Anim. Sci. 36, 908 - 913

Krieger D.T. und Fogel M. (1972)

Lack of circadian periodicity of radioimmunoassayable plasma
LH and FSH levels

Exc. Med. Intern. Congr. Ser. 256, 185

Kuhl H., Rosinatoski C. und Taubert H.-D. (1974)

The role of hypothalamic L-cystine arylamidase activity in the
feed-back mechanism of gonadotrophin release

20. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. Tübingen

Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 16

Kuhl H. und Taubert H.-D. (1975 a)

Inactivation of luteinizing hormone releasing hormone by rat
hypothalamic L-cystine arylamidase

Acta endocr. (Kbh.) 78, 634 - 648

Kuhl H. und Taubert H.-D. (1975 b)

Short-loop feedback mechanism of luteinizing hormone: LH
stimulates hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate
LH-RH in the rat hypothalamus

Acta endocr. (Kbh.) 78, 649 - 663

Kuhl H., Kaplan H.-G. und Taubert H.-D. (1976)

Die Wirkung eines neuen Analogs des LH-RH, D-Ser(TBU)⁶-EA¹⁰-LH-RH,
auf die Gonadotropinfreisetzung bei Männern

Dtsch. med. Wschr. 101, 361 - 364

Kulin H.E. und Reiter E.O. (1973)

Gonadotrophin suppression by low dose of oestrogen in man:
evidence for differential effects upon FSH and LH

J. Clin. Endocr. Metab. 35, 836 - 839

Labhsetwar A.P., Collins W.E., Tyler W.J. und Casida L.E. (1964)

Some pituitary-ovarian relationships in the periparturient
cow

J. Reprod. Fert. 8, 85 - 90

Labhsetwar A.P. (1972)

Further evidence for synergism between LH and FSH in the
induction of ovulation in rats; lack of effects of prolactin

J. Reprod. Fert. 29, 435 - 438

Ladosky W. und Noronha J.G.L. (1974)

Further evidence for an inhibitory role of serotonin in the
control of ovulation

J. Endocr. 62, 677 - 678

Landefeld T.D. und McShan W.H. (1974)

Isolation and characterization of subunits from equine
pituitary follicle-stimulating hormone

J. biol. Chem. 249, 3527 - 3531

Lee V.W.K., Cumming I.A., de Kretser D.M., Findlay J.K., Hudson B.
und Keogh E.J. (1975 a)

Patterns of LH and FSH and testosterone levels in the
developing ram

J. Reprod. Fert. 43, 378

Lee V.W.K., de Kretser D.M., Hudson B. und Wang C. (1975 b)

Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male
rats from birth to sexual maturity

J. Reprod. Fert. 42, 121 - 126

- Leidenberger F. und Reichert L.E. Jr. (1972)
Evaluation of a rat testis homogenate radioligand receptor
assay for human pituitary LH
Endocrinology 91, 901 - 909
- Leidl W. und Biegert W. (1967)
Pubertät und Zuchtreife bei Höhenfleckviehtieren
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 80, 345 - 348
- Levin L. und Tyndale H.H. (1937)
The quantitative assay of "follicle-stimulating" substances
Endocrinology 21, 619 - 628
- Lewis A.C., Candler W.V. und Lamond D.R. (1972)
Simulation of bovine ovarian follicle changes
Proc. Amer. Soc. Anim. Sci. (West Sec.) 23, 597 - 603
- L'Hermite M. und Midgley A.R. Jr. (1971)
Radioimmunoassay of human follicle-stimulating hormone with
antisera to the ovine hormone
J. Clin. Endocr. Metab. 33, 68 - 76
- L'Hermite M., Niswender G.D., Reichert L.E. Jr. und Midgley A.R. Jr.
(1972)
Serum follicle-stimulating hormone in sheep as measured by
radioimmunoassay
Biol. Reprod. 6, 325 - 332
- Li Ch.H., Squire P.G. und Gröschel U. (1960)
Purification and properties of human pituitary follicle-
stimulating and interstitial cell stimulating hormones
Arch. Biochem. Biophys. 86, 110 - 116
- Li Ch.H. (1972)
Hormones of the adenohipophysis
Proc. Amer. Philosoph. Soc. 116, 365 - 382

Liao T.-H. und Pierce J.G. (1970)

The presence of a common type of subunit in bovine
thyroid-stimulating and luteinizing hormone
J. biol. Chem. 245, 3275 - 3281

Libertun C. und McCann S.M. (1974)

Further evidence for cholinergic control of gonadotropin and
prolactin secretion
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 147, 498 - 504

Licht P. und Papkoff H. (1971)

Gonadotropic activity of the subunits of ovine FSH and LH in
the lizard *Anolis carolinensis*
Gen. Comp. Endocrinol. 16, 586 - 593

Lincoln G.A. (1976 a)

Seasonal variation in the episodic secretion of luteinizing
hormone and testosterone in the ram
J. Endocr. 69, 213 - 226

Lincoln G.A. (1976 b)

Secretion of LH in rams exposed to two different photoperiods
J. Reprod. Fert. 47, 351 - 353

Lindner H.R. (1959)

Androgens in the bovine testis and spermatic vein blood
Nature 183, 1605 - 1606

Lindner H.R. (1961)

Androgens and related compounds in the spermatic vein blood
of domestic animals
J. Endocr. 23, 139 - 159

Linkie D.M. und Niswender G.D. (1972)

Serum levels of prolactin, luteinizing hormone, and follicle stimulating hormone during pregnancy in the rat
Endocrinology 90, 632 - 637

Lloca P. de la (1972)

Gonadotropines hypophysaires animales, LH et FSH:
structure chimique et relation structure primaire activité
biologique
In: Jutisz M. (Hrsg.)
Hormones glycoprotéiniques hypophysaires
Inserm Colloque, 1972

Long J.A. und Evans H.M. (1922)

The oestrous cycle in the rat
University of California Press, Berkeley

Lu K.H., Koch Y. und Meites J. (1971)

Direct inhibition by ergocornine of pituitary prolactin
release
Endocrinology 89, 229 - 233

Macmillan K.L. und Hafs H.D. (1969)

Reproductive tract of Holstein bulls from birth through
puberty
J. Anim. Sci. 28, 233 - 239

Malven P.V. und Hoge W.R. (1971)

Effect of ergocornine on prolactin secretion by hypophysial
homografts
Endocrinology 88, 445 - 449

Marchalonis J.J. (1969)

An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins
and other proteins
Biochem. J. 113, 299 - 305

Marsh J. (1971)

The effect of prostaglandin on the adenylyl cyclase of the bovine corpus luteum

Ann. N.Y. Acad. Sci. 180, 416 - 424

Matsuo H., Baba Y., Nair R.M.G., Arimura A. und Schally A.V. (1971 a)

Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone

I. The proposed amino acid sequence

Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 1334 - 1339

Matsuo H., Arimura A., Nair R.M.G. und Schally A.V. (1971 b)

The synthesis of porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method

Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 822 - 828

McCann S.M., Taleisnik S. und Friedmann H.M. (1960)

LH-releasing activity in hypothalamic extracts

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 432

McCann S.M. und Ramirez V.D. (1964)

The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion

Rec. Prog. Horm. Res. 20, 131 - 181

McCann S.M. und Porter J.C. (1969)

Hypothalamic pituitary stimulating and inhibiting hormones

Physiol. Rev. 49, 240 - 284

McDonald L.E. (1971)

Veterinary endocrinology and reproduction

1. Nachdruck

Lea & Febiger, Philadelphia, Mass., U.S.A.

McIlhinney J. und Schulster D. (1974)

The preparation of biologically active ^{125}I -labelled
adrenocorticotrophic hormones by a simple enzymic radio-
iodination procedure utilizing lactoperoxidase
Endocrinology 94, 1259 - 1264

McNeilly A.S. und Hagen C. (1974)

Prolactin, TSH, LH and FSH responses to a combined LH-RH/TRH
test at different stages of the menstrual cycle
Clin. Endocr. 3, 427 - 435

McNutt G.W. (1928)

The corpus luteum of pregnancy in the domestic cow (*bos taurus*)
and a brief discussion of cyclical ovarian changes
J. Amer. vet. med. Ass. 72, 286 - 299

Mellin T.N. und Erb R.E. (1966)

Estrogen metabolism and excretion during the bovine estrous
cycle
Steroids 7, 589 - 606

Mellin T.N., O'Shanny W.J. und Busch R.D. (1975)

Induction of follicle growth and ovulation in prepuberal
heifers and ewes with synthetic gonadotropin releasing
hormone
Theriogenology 4, 41 - 58

Midgley A.R. Jr. (1967)

Radioimmunoassay for human follicle-stimulating hormone
J. Clin. Endocr. Metab. 27, 295 - 299

Midgley A.R. Jr. (1971)

Heterologous and homologous radioimmunoassays: Species
specificity considerations
In: Odell W.D. und Daughaday W.H. (Hrsg.)
Principles of competitive protein-binding assays, 419 - 426
J.B. Lippincott Comp., Philadelphia - Toronto

Mongkonpunya K., Hafs H.D., Convey E.M., Oxender W.D. und Louis T.M.
(1974)

Luteinizing hormone release by gonadotropin releasing hormone
before and after castration in bulls

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 147, 873 - 877

Mongkonpunya K., Hafs H.D., Convey E.M., Tucker H.A. und
Oxender W.D. (1975)

Serum luteinizing hormone, testosterone and androstendione in
pubertal and prepubertal bulls after gonadotropin releasing
hormone

J. Anim. Sci. 40, 682 - 686

Moore N.W. (1975)

The control of time of oestrus and ovulation and the induction
of superovulation in cattle

Aust. J. Agric. Res. 26, 295 - 304

Mori J., Endo T., Takahashi T. und Masaki J. (1974)

Release of LH after administration of an analog of synthetic
LH-RH in cattle

Theriogenology 1, 177 - 180

Morrison M. und Bayse G.S. (1970)

Catalysis of iodination by lactoperoxidase

Biochemistry 9, 2995 - 3000

Morrow D.A., Roberts S.J. und McEntee K. (1969)

A review of postpartum ovarian activity and involution of the
uterus and cervix in cattle

Cornell Vet. 59, 134 - 154

Mortimer C.H., Besser G.M., McNeilly A.S. und Goldie D.J. (1973)
Asynchronous pulsatile luteinizing hormone and follicle-
stimulating hormone responses during luteinizing hormone-
follicle-stimulating hormone releasing hormone and thyroid-
stimulating hormone releasing hormone infusions
J. Endocr. 59, XII - XIII

Mortimer C.H., Besser G.M., Hook J. und McNeilly A.S. (1974 a)
Intravenous, intramuscular, subcutaneous and intranasal
administration of LH/FSH-RH: the duration of effect and
occurrence of asynchronous pulsatile release of LH and FSH
Clin. Endocr. 3, 19 - 25

Mortimer C.H., Besser G.M., Goldie D.J., Hook J. und McNeilly A.S.
(1974 b)
The TSH, FSH and prolactin responses to continous infusions
of TRH and the effects of oestrogen administration in
normal males
Clin. Endocr. 3, 97 - 103

Mühlen A. von zur, Köbberling J., Warnecke U. und Baiker H. (1972)
Die Wirkung eines synthetischen "luteotropin releasing
factor" auf die Freisetzung von LH und FSH bei verschiedenen
Funktionszuständen der Hypophyse
Dtsch. Med. Wschr. 97, 482 - 483

Mühlen A. von zur und Köbberling J. (1973)
Effect of testosterone on the LH and FSH release induced by
LH-releasing factor (LRF) in normal men
Horm. Metab. Res. 5, 266 - 270

Murr S.M., Geschwind I.I. und Bradford B.E. (1973)
Plasma LH, FSH, and prolactin during pregnancy in the mouse
Biol. Reprod. 9, 75

- Murr S.M., Geschwind I.I. und Bradford G.E. (1975)
Plasma LH and FSH during different oestrous cycle conditions
in mice
J. Reprod. Fert. 32, 221 - 230
- Naftolin F., Yen S.S.C. und Tsai C.C. (1972)
Rapid cycling of plasma gonadotrophins in normal men as
demonstrated by frequent sampling
Nature New Biology 236, 92 - 93
- Nalbandov A.V. und Casida L.E. (1940)
Gonadotropic action of pituitaries from pregnant cows
Endocrinology 27, 559 - 566
- Nalbandov A.V. (1976)
Reproductive Physiology of mammals and birds
3rd edition
W.H. Freeman and Company, San Francisco, U.S.A.
- Nauta W.J.H. (1960)
Electrical studies on the unanesthetized brain
In: Ramey E.R. und O'Doherty D.S.
Contemporary research methods in neuroanatomy, 1 - 16
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Neal P. und Baker T.G. (1975)
Response of mouse graafian follicles in organ culture to
varying doses of follicle-stimulating hormone and luteinizing
hormone
J. Endocr. 65, 27 - 32
- Neumann F. und Steinbeck H. (1972)
Influence of sexual hormones on the differentiation of neural
centers
Arch. Sex. Behav. 2, 147 - 162

- Niskerk C.H. van., Belonje P.C. und Morgenthal J.C. (1974)
Oestrus synchronization in cattle using progesterone and
PgF analogue
Theriogenology 2, 73 - 75
- Nimrod A., Erickson G.F. und Ryan K.J. (1976)
A specific FSH receptor in rat granulosa cells: properties of
binding in vitro
Endocrinology 98, 56 - 64
- Niswender G.D., Reichert L.E.Jr., Midgley A.R.Jr. und Nalbandov A.V.
(1969)
Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone
Endocrinology 84, 1166 - 1173
- Niswender G.D. und Spies H.G. (1973)
Serum levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating
hormone and progesterone throughout the menstrual cycle of
rhesus monkeys
J. Clin. Endocr. Metab. 37, 326 - 328
- Nuti L.C., Grimek H.J., Braselton W.E. Jr. und McShan W.H. (1972)
Chemical properties of equine pituitary follicle-stimulating
hormone
Endocrinology 91, 1418 - 1422
- Obst J.M., Seamark R.F. und Brown J.M. (1971)
Application of a competitive protein-binding assay for
oestrogens to the study of ovarian function in sheep
J. Reprod. Fert. 24, 140
- Odell W.D., Rayford P.L. und Ross G.T. (1967)
Simplified, partially automated method for radioimmunoassay of
human thyroid-stimulating, growth, luteinizing and follicle
stimulating hormones
J. Lab. Clin. Med. 70, 973 - 980

- Odell W.D., Reichert L.E. Jr. und Bates R.W. (1968)
Pitfalls in the radioimmunoassay of carbohydrate containing
polypeptide hormones
In: Mergoulies M. (Hrsg.)
Protein and polypeptide hormones
Int. Congr. Series 161, part 1, 124
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam
- Odell W.D., Hescox M.A. und Kiddy C.A. (1970)
Studies of hypothalamic-pituitary-gonadal interrelations in
prepubertal cattle
In: Butt W.R., Crooke A.C. und Ryle M. (Hrsg.)
Gonadotrophins and ovarian development, 371 - 385
E. & S. Livingstone, Edinburgh - London
- Odell W.D. und Moyer D.L. (1971)
Physiology of reproduction
The C.V. Mosby Comp., Saint Louis
- Odell W.D. und Daughaday W.H. (Hrsg.) (1971)
Principles of competitive protein-binding assays
J.B. Lippincott Co., Philadelphia - Toronto
- Ojeda S.R. und Ramirez V.D. (1969)
Automatic control of LH and FSH secretion by short feedback
circuits in immature rats
Endocrinology 84, 786 - 797
- Okada Y., Kitamura K., Baba Y., Arimura A. und Schally A. V. (1973)
Luteinizing hormone-releasing hormone analogs lacking
N-terminal pGlu-ring structure
Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1180 - 1186
- Onuma H., Hahn J. und Foote R.H. (1970)
Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of
superovulated ova in prepubertal cattle
J. Reprod. Fert. 21, 119 - 126

- Pahnke V.G., Leidenberger F.A. und Künzig H.J. (1974)
Correlation between rat testicular HCG (LH)-binding capacity,
leydig cell number and testicular secretory function throughout
pubescence
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 138
- Papkoff H., Mahlmann L.- J. und Li Ch. H. (1967 a)
Some chemical and physical properties of human pituitary
follicle-stimulating hormone
Biochemistry 6, 3976 - 3982
- Papkoff H., Gospodarowicz D. und Li Ch. H. (1967 b)
Purification and properties of ovine follicle-stimulating
hormone.
Arch. Biochem. Biophys. 120, 434 . 439
- Papkoff H. und Ekblad M. (1970)
Ovine follicle stimulating hormone: preparation and
characterization of its subunits
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 614 - 621
- Papkoff H. (1971)
The subunit nature of interstitial cell-stimulating hormone and
follicle-stimulating hormone
In: Margoulies M. und Greenwood F.C.
Structureactivity relationships of protein and polypeptide
hormones
Int. Congr. Series 241, part 1, 73 - 79
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam - London
- Parlow A.F., Daane T.A. und Dignam W.J. (1970)
On the concentration of radioimmunoassayable FSH circulating
in blood throughout human pregnancy
J. Clin. Endocr. Metab. 31, 213 - 214

Parvizi N. und Ellendorff F. (1974)

Neuere Erkenntnisse der Endokrinologie der Fortpflanzung bei
Haustieren

4. Folge: Neuroendokrine Integration

Dtsch. tierärztl. Wschr. 81, 254 - 257

Peckham W.D., Dierschke D.J. und Knobil E. (1973)

Gonadal function and the biological and physicochemical
properties of follicle-stimulating hormone

Endocrinology 92, 1660 - 1666

Pelletier J. (1976)

Influence of LH-RH on LH and FSH releases in domestic
mammals

Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 16, 213 - 234

Peterson A.J., Fairclough R.J. und Smith J.F. (1975)

Radioimmunoassay of estradiol-17 B in bovine peripheral plasma
with and without chromatography

Steroids 25, 487 - 496

Pharris B.B. und Wyngarden L.J. (1969)

The effect of $PgF_{2\alpha}$ on the progestagen content of the ovaries
from pseudopregnant rats

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 130, 92 - 94

Pharris B. (1971)

Prostaglandin induction of luteolysis

Ann. N.Y. Acad. Sci. 180, 436 - 444

Pierce J.G., Liao T.-H., Carlsen R.B. und Reimo T. (1971)

Comparisons between the α -chains of bovine thyrotrophin and
the α -chain of luteinizing hormone

J. biol. Chem. 246, 866 - 872

Pierce J.G. (1973)

General chemistry and characterization of glycoproteins of the pituitary

In: Berson S.A. und Yalow R.S. (Hrsg.)

Methods in investigative and diagnostic endocrinology, part 2 A, 433 - 445

North Holland Publishing Comp., Amsterdam - London

Popa G.T. und Fielding U. (1930)

A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region

J. Anat. (London) 65, 88 - 91

Rajamahendran R., Sedirian K.N., Lague P.C. und Baker R.D. (1976)

Luteolytic activity of a synthetic prostaglandin and $\text{PGF}_{2\alpha}$ in heifers

Prostaglandins 11, 143 - 153

Rajaniemi H., Tuohimaa P. und Niemi M. (1970)

Enzymic radioiodination of pituitary gonadotrophins for radioautography

Histochemie 23, 342 - 348

Rakha A.M. und Robertson H.A. (1965)

Changes in levels of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the bovine pituitary gland at ovulation

J. Endocr. 31, 245 - 249

Rakha A.M. (1967)

Normal control of ovulation in cattle and sheep

Animal Science research institute, National research centre,

United Arab Republic, Inf. series I, 1 - 40

- Rakha A.M. und Igboeli G. (1972)
Physiology of pregnancy in tropically adapted cattle.
II. Changes in maternal and fetal pituitary follicle
stimulating hormone and luteinizing hormone content
throughout pregnancy
J. Anim. Sci. 34, 266 - 269
- Ramirez D.V. und McCann S.M. (1963)
Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH)
secretion in immature and adult rats
Endocrinology 72, 452 - 464
- Rayford P.L., Brinkley H.J., Young E.P. und Reichert L.E. Jr.
(1974)
Radioimmunoassay of porcine FSH
J. Anim. Sci. 39, 348 - 354
- Rawlings N.C., Hafs H.D. und Swanson L.V. (1972)
Testicular and blood plasma androgens in Holstein bulls
from birth through puberty
J. Anim. Sci. 34, 435 - 440
- Reeves J.J., Arimura A., Schally A.V., Kragt C.L., Beck T.W. und
Casey J.M. (1972)
Effects of synthetic luteinizing hormone-releasing
hormone/follicle-stimulating hormone-releasing hormone
(LH-RH/FSH-RH) on serum LH, serum FSH and ovulation in
anestrous ewes
J. Anim. Sci. 35, 84 - 89
- Reichert L.E. Jr. und Jiang N.S. (1965)
Studies on bovine pituitary follicle stimulating hormone
Endocrinology 77, 124 - 127
- Reichert L.E. Jr. (1967)
Further studies on species differences in follicle
stimulating hormone as revealed by the slope in the
Steelman-Pohley assay
Endocrinology 80, 1180 - 1181

Reichert L.E. Jr. und Treadwell P.E. (1967)

Cross-reactivity of antibody to human and bovine luteinizing hormone (LH) with homologous and heterologous LH
Endocrinology 81, 591 - 598

Reichert L.E. Jr. und Midgley A.R. Jr. (1968)

Preparation of purified rat follicle stimulating hormone and luteinizing hormone
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 128, 1001 - 1004

Reichert L.E. Jr., Kathan R.H. und Ryan R.J. (1968)

Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle stimulating hormone (FSH): comparison with luteinizing hormone (LH)
Endocrinology 82, 109 - 114

Reichert L.E. Jr. (1971)

Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing
Endocrinology 88, 1029 - 1044

Reinhardt V. und Schams D. (1975)

Unimpaired prolactin response to teat stimulation during diminished response to continuous infusions of TRH
Horm. Metab. Res. 7, 359 - 360

Reyes F.I., Winter J.S.D. und Faiman C. (1972)

Pituitary-ovarian interrelationship during the puerperium
Amer. J. Obstet. Gynecol. 114, 589 - 594

Richards J.S. und Midgley A.R. Jr. (1976)

Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development
Biol. Reprod. 14, 82 - 94

Rippel R.H., Johnsson E.G., White W.F., Fujio M., Yamazaki J.
und Nakayama R. (1973)

Ovulating and LH-releasing activity of a highly potent
analog of synthetic gonadotropin-releasing hormone
Endocrinology 93, 1449 - 1452

Ritzén E.M., Johnsonbaugh R.E., Dym M., French F.S. und Hansson V.
(1976)

Demonstration of an androgen binding protein (ABP) in monkey
rete testis fluid
Proc. V Int. Congr. of Endocrinology, Hamburg, 212

Riveille P., Robinson A., Kamen M. und Milhaud G. (1971)

Synthèse en phase solide de l'hormone de libération de
l'hormone lutéotrophique (LH-RH)
Helv. Chim. Acta 54, 2772 - 2775

Robertson H.A. und Hutchinson J.S.M. (1962)

The levels of FSH and LH in the pituitary of the ewe in
relation to follicular growth and ovulation
J. Endocr. 24, 143 - 151

Robertson H.A. und Rakha A.M. (1966)

The sequence, time and duration of the release of follicle-
stimulating hormone and luteinizing hormone in relation to
oestrus and to ovulation in the sheep
J. Endocr. 35, 177 - 184

Roche J.F. (1975)

Control of time of ovulation in heifers treated with
progesterone and gonadotrophin-releasing hormone
J. Reprod. Fert. 43, 471 - 477

Rogol A.D. und Rosen S.W. (1974)

Alteration of human and bovine prolactins by a chloramine-T
radioiodination: comparison with lactoperoxidase-iodinated
prolactins

J. Clin. Endocr. Metab. 39, 379 - 382

Roos P. (1968)

Human follicle stimulating hormone

Acta endocr. (Kbh.) 59, Suppl. 131, 1 - 93

Ross G.T., van Hell E.V., Vaitukaitis J.L., Braunstein G.D. und
Rayford P.L. (1972)

Sialic acid and the immunologic and biologic activity of
gonadotrophins

In: Saxena B.B., Belling C.C. und Gandy H.M. (Hrsg.)

Gonadotrophins, 417 - 423

John Wiley & Sons Inc., New York

Roth E. (1969)

Die geschlechtliche Entwicklung bei Ebern unter besonderer
Berücksichtigung der Möglichkeit frühzeitiger Spermagewinnung
(vergleichende Untersuchungen an Deutschen varedelten Land-
schweinen und Göttinger Miniaturschweinen)

Diss. agr., Göttingen

Rüsse M. (1965)

Der Geburtsablauf beim Rind

Arch. exp. Vet.-Med. 19, 760 - 870

Rüsse M. (1968)

Beziehungen zwischen Uterusinvolution und Konzeptionsfähigkeit
beim Rind

Zuchthyg. 3, 183 - 190

Rüsse I. (1971)

Größe des Corpus luteum und Follikelanbildung während der
Gravidität bei Rind und Schaf
Zuchthyg. 6, 126 - 134

Ryan R.J., Jiang N.S. und Hanlon S. (1971)

Physical properties of human follicle-stimulating hormone
Biochemistry 10, 1321 - 1330

Said A.H. und Wide L. (1973)

Serum levels of FSH and LH following normal parturition
Acta Obstet. Gynec. Scand. 52, 361 - 365

Salamonsen L.A., Burger H.G., Chamley W.A. und Goding J.R. (1973 a)

Studies on a radioimmunoassay for ovine follicle stimulating
hormone: interference by ovine albumin
Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 51, 83 - 92

Salamonsen L.A., Jones H.A., Burger H.G., Buckmaster J.M.,

Chamley W.A., Cumming I.A., Findlay J.K. und Goding J.R. (1973 b)

A heterologous radioimmunoassay for follicle stimulating
hormone: application to measurement of FSH in the ovine
estrous cycle and in several other species including man
Endocrinology 93, 94 - 102

Sandow J., Schally A.V., Schröder H.G., Redding T.W., Heptner W.
und Vogel H.G. (1972)

Pharmacological characteristics of a synthetic releasing
hormone LH/FSH-RH (Hoe 471)
Arzneimittel-Forschung 22, 1718 - 1721

Sandow J., Enzmann F., Arimura A., Redding T.W. und Schally A.V.
(1975)

Purification and characterization of two porcine hypothalamic
fractions with LH-releasing activity: evidence for a single
LH and FSH-releasing hormone
Acta endocr. (Kbh.) 80, 209 - 219

Sandow J. (1976)

Releasing factors: recent developments in hormone analogues
used for stimulation or inhibition of fertility
Symposium on Fertility of the Society for Drug Research,
14. Juli 1976, London

Sandow J., König W. und Rechenberg W. von (1976)

Endocrine activity of a highly active analogue of LH-RH
Proc. V Intern. Congr. of Endocrinology, Hamburg, 20

Saumande J. und Pelletier J. (1975)

Relationship of plasma levels of oestradiol-17 B and
luteinizing hormone with ovulation rate in superovulated
cattle
J. Endocr. 64, 189 - 190

Savard K., Mason N.R., Ingram I.T. und Gassner F.X. (1961)

The androgens of bovine spermatid venous blood
Endocrinology 69, 324 - 330

Sawyer C.H. und Kawakami M. (1959)

Characteristics of behavioral and electroencephalographic
after-reactions to copulation and vaginal stimulation in
the female rabbit
Endocrinology 65, 622 - 630

Sawyer C.H. und Kawakami M. (1961)

Interactions between the central nervous system and hormones
influencing ovulation
In: Villée C.A.
Control of ovulation, 79 - 97
Pergamon Press New York

Sawyer C.H. (1975)

Some recent developments in brain-pituitary-ovarian physiology
Neuroendocrinology 17, 97 - 124

Saxena B.B. und Rathnam P. (1968)

Purification and properties of human pituitary FSH

In: Rosenberg E. (Hrsg.)

Gonadotropins, 3 - 12

Geron-X, Los Altos, Calif., U.S.A.

Schallenger E. und Schams D. (1975)

FSH-Bestimmungen im Rinderblut unter physiologischen und pathologischen Bedingungen während Zyklus und Post-partum-Phase

Zuchthyg. 10, 75

Schally A.V., Redding T.W., Bowers C.Y. und Barrett J.F. (1969)

Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone

J. biol. Chem. 244, 4077 - 4088

Schally A.V., Arimura A., Baba Y., Nair R.M.G., Matsuo H.,

Redding T.W., Debeljuk L. und White W.F. (1971 a)

Isolation and properties of the LH and FSH releasing hormone

Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 393 - 399

Schally A.V., Arimura A., Kastin A.J., Matsuo H., Baba Y.,

Redding T.W., Nair R.M.G., Debeljuk L. und White W.F. (1971 b)

Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones

Science 173, 1036 - 1038

Schally A.V., Kastin A.J. und Arimura A. (1971 c)

Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology and clinical studies

Fertil. Steril. 22, 703 - 721

Schally A.V., Arimura A., Carter W.H., Redding T.W., Geiger R.,
König W., Wissman H., Jaeger G., Sandow J., Yanaihara N.,
Yanaihara C., Hashimoto T. und Sakagami M. (1972)

Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) activity of some
synthetic polypeptides.

I. Fragments shorter than decapeptide

Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 366 - 375

Schally A.V., Redding T.W. und Arimura A. (1973)

Effect of sex steroids on pituitary response to LH- and
FSH-releasing hormone in vitro

Endocrinology 93, 893 - 902

Schams D. und Karg H. (1969 a)

Radioimmunologische LH-Bestimmung im Blutserum von Rind unter
besonderer Berücksichtigung des Brunstzyklus

Acta endocr. (Kbh.) 61, 96 - 103

Schams D. und Karg H. (1969 b)

Zeitlicher Verlauf und analytische Erfassbarkeit des endogen
bzw. exogen erhöhten Blutspiegels an Luteinisierungshormon beim
Rind

Zuchthyg. 4, 61 - 65

Schams D. und Karg H. (1970 a)

Studien über die Spezifität des Radioimmunotests zur Bestimmung
des Luteinisierungshormons im Rinderblut

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 41 - 46

Schams D. und Karg H. (1970 b)

Untersuchungen über Prolaktin im Rinderblut mit einer
radioimmunologischen Bestimmungsmethode

Zbl. Vet. Med., Reihe A, 17, 193 - 212

Schams D. und Butz D. (1972)

Plasma level of luteinizing hormone in female and male calves from birth until puberty

VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem., München

Band 3, 2175 - 2178

Schams D., Hoffmann B., Fischer S., März E. und Karg H. (1972)

Simultaneous determination of LH and progesterone in peripheral bovine blood during pregnancy, normal and corticoid-induced parturition and the post-partum period
J. Reprod. Fert. 29, 37 - 48

Schams D., Höfer F., Hoffmann H., Ender M.L. und Karg H. (1973)

Effects of synthetic LH-RH treatment on bovine ovarian function during estrous cycle and post partum period
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 177, 296

Schams D. (1974)

Untersuchungen über Prolaktin beim Rind

Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung, Heft 5
(Beiheft zur Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde)

Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin

Schams D. und Schallenger E. (1974)

Die Bestimmung von Rinder-FSH mit Hilfe einer radioimmunologischen Methode - physiologische Ergebnisse
Zuchthyg. 9, 73

- Schams D., Höfer F., Schallenberg E., Hartl M. und Karg H. (1974)
Pattern of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in bovine blood plasma after injection of a synthetic gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH)
Theriogenology 1, 137 - 151
- Schams D. und Schallenberg E. (1976)
Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone and its application during the oestrous cycle in cattle
Acta endocr. (Kbh.) 81, 461 - 473
- Schams D., Toth G., Schallenberg E., Hoffmann B. und Karg H. (1976)
Relationship between hormonal parameters and ovarian morphology as observed by pelviscopy during the oestrous cycle in cattle
Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.,
Krakau, Juli 1976, 229
- Schenk H. von, Larsson J. und Thorell J.J. (1976)
Improved radioiodination of glucagon with the lactoperoxidase method. Influence of pH on iodine substitution
Clin. Chim. Acta 69, 225 - 232
- Schlaff S., Rosen S. und Roth J. (1968)
Antibodies to human follicle stimulating hormone:
complete cross reactivity with three other hormones
J. Clin. Invest. 47, 1722 - 1729
- Schuetz A.W. (1974)
Role of hormones in oocyte maturation
Biol. Reprod. 10, 150 - 178
- Schwartz N.B. (1974)
The role of FSH and LH and of their antibodies on follicle growth and on ovulation
Biol. Reprod. 10, 236 - 272

Schwyzer R. (1968)

Relationship of structure to activity of polypeptide hormones
In: Margolis M. (Hrsg.)
Protein and polypeptide hormones
Int. Congr. Ser. (ICS) 161, part 1, 201 - 207
Exc. Med. Found. (Amst.)

Seguin B.E., Convey E.M. und Oxender W.D. (1976)

Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic
gonadotropin on cows with ovarian follicular cysts
Am. Vet. Res. 37, 153 - 157

Selstam G., Rosberg S., Liljekvist J., Grönquist L., Parklev T. und
Ahrén K. (1976)

Differences in action of LH and FSH on the formation of
cyclic AMP in the prepubertal rat ovary
Acta endocr. (Kbh.) 81, 150 - 164

Shemesh M., Ayalon N. und Lindner H.R. (1972)

Estradiol levels in the peripheral blood of cows during the
estrous cycle
J. Endocr. 55, 73 - 78

Sherwood O.D., Grimek H.J. und McShan W.H. (1970)

Purification and properties of follicle-stimulating hormone
from sheep pituitary glands
J. biol. Chem. 245, 2328 - 2336

Shome B. und Parlow A.F. (1974 a)

Human follicle stimulating hormone (hFSH): first proposal for
the amino acid sequence of the α -subunit (hFSH- α) and first
demonstration of its identity with the α -subunit of human
luteinizing hormone (hLH- α)
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 199 - 202

Shome B. und Parlow A.F. (1974 b)

Human follicle stimulating hormone: first proposal for the amino acid sequence of the hormone specific β -subunit (hFSH- β)
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 203 - 205

Shownkeen R.C., Thomas M.B., Stockell Hartree A. und Stevens V.C.
(1973)

A note on the purification of follicle-stimulating and luteinizing hormones from baboon pituitaries
J. Endocr. 59, 659 - 660

Shownkeen R.C., Stockell Hartree A., Steward F., Mashiter K. und Stevens V.C. (1976)

Purification and properties of the subunits of human pituitary follicle-stimulating hormone
J. Endocr. 69, 263 - 273

Simpson M.E., Li Ch.H. und Evans H.M. (1951)

Synergism between pituitary follicle stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotrophin
Endocrinology 48, 370 - 383

Simpson M.E. (1959)

Reproduction in domestic animals, 1 - 59
Academic Press New York - London

Smirnova E.J. (1945)

Cyclical changes in the content of gonadotrophic and thyrotrophic hormones in the anterior lobe of the pituitary
Bull. Exp. Biol. Med. 19, 67 - 69

Smith K.D., Tcholakian R.K., Chowdhury M. und Steinberger E. (1974)

Rapid oscillations in plasma levels of testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in men
Fertil. Steril. 25, 965 - 975

Snook R.B. (1968)

Immunological and biological properties of antiserum to bovine LH

In: Margoulis M. (Hrsg.)

Proc. Int. Symp. "Protein and polypeptide hormones"

Liège, Mai 1968

Int. Congr. Series (ICS) 161, part 2, 398 - 400

Excerpta Medica Foundation, Amsterdam

Sönksen P.H. (Hrsg.) (1974)

Radioimmunoassay and saturation analysis

Brit. Med. Bull. 30

Souvatzoglou A., Metzger J., Kullak W., Butenandt O. und Henderkott U. (1973)

The functional significance of "episodic" secretion

Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 173, 42

Spilman C.H., Seidel G.E. Jr., Larson L.L., Vukman G.R. und Foote R.H. (1973)

Pregesterone, 20 B-hydroxypregn-4-en-3-one, and luteinizing hormone levels in superovulated prepuberal and postpuberal cattle

Biol. Reprod. 9, 116 - 124

Spona J. (1975)

Some structural requirements for LH-RH actions

Endocr. Exp. 9, 159 - 165

Stangl J. (1974)

Der Einfluß der Prolaktinhemmung mit CB-154 auf die lysosomalen Enzyme im Eutersekret des Rindes und auf das Ingangkommen der Ovarfunktion in der Post-partum-Phase
Diss. med. vet. München

Steelman S.L. und Pohley F.M. (1953)

Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin
Endocrinology 53, 604 - 616

Steinberger A. und Steinberger E. (1976)

Evidence for an FSH-inhibiting Sertoli cell-factor
Proc. V Int. Congr. of Endocrinology, Hamburg, 211

Stellflug J.N., Louis T.M., Hafs H.D. und Seguin B.E. (1975)

Luteolysis, estrus and ovulation, and blood prostaglandin F after intramuscular administration of 15, 30 or 60 mg prostaglandin F_{2α}
Prostaglandins 9, 609 - 615

Stockardt Ch. R. und Papanicolaou G.N. (1917)

The existence of a typical oestrous cycle in the guinea pig - with a study of its histological and physiological changes
Amer. J. Anat. 22, 225 - 284

Stockell Hartree A., Mills J.B., Welch R.A.S. und Thomas M. (1968)

Fractionation of protein hormones from horse pituitary glands
J. Reprod. Fert. 17, 291 - 303

Studer R.O. (1976)

Chemistry of releasing hormones
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 202, 12 - 15

Swerdloff R.S. und Odell W.D. (1968)

Some aspects of the control of secretion of LH and FSH in humans
In: Rosemberg E. (Hrsg.)
Gonadotropins, 155 - 162
Geron-X, Los Altos, Calif., U.S.A.

Szontágh F.E. (1973)

Short-loop ("internal") pituitary-hypothalamus gonadotropin feedback in the human
Endocr. exp. 7, 65 - 67

Tepperman J. (1972)

Physiologie des Stoffwechsels und des Endokrinums
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart - New York

Thibier M. (1975)

Variations circadiennes de la LH plasmatique chez le jeune taurillon
Ann. Endocr. 36, 205 - 210

Thibier M. (1976)

Effect of synthetic gonadotrophin-releasing hormone (Gn-RH) on circulating luteinizing hormone (LH) and testosterone in young post-pubertal bulls
Acta endocr. (Kbh.) 81, 635 - 643

Thorell J.J. und Johansson B.G. (1971)

High specific activity labelling of glycoprotein hormones by means of lactoperoxidase
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 251, 363 - 369

Tsafiriri A., Lieberman M.E., Koch Y., Bauminger S., Chobsieng P., Zor U. und Lindner H.R. (1976)

Capacity of immunologically purified FSH to stimulate cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in graafian follicles and to induce ovum maturation in the rat
Endocrinology 98, 655 - 661

- Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag B. und Ross G.T. (1971)
A method for producing specific antisera with small doses of
immunogen
J. Clin. Endocr. Metab. 33, 988 - 991
- Voglmayr J.K. (1976)
Persönliche Mitteilung
- Wagner W.C. (1968 a)
Reproductive Physiology of the postpartum cow
Doctor of philosophy, Cornell University
- Wagner W.C. (1968 b)
Physiology of the postpartum female
Iowa State Univ. Vet. 30, 75 - 77
- Wagner W.C., Staatman R. und Hansel W. (1969 a)
Reproductive physiology of the postpartum cow
I. Clinical and histological findings
J. Reprod. Fert. 18, 493 - 500
- Wagner W.C., Staatman R. und Hansel W. (1969 b)
Reproductive physiology of the postpartum cow
II. Pituitary, adrenal and thyroid function
J. Reprod. Fert. 18, 501 - 509
- Wagner W.C. und Oxenreider S.L. (1971)
Endocrine physiology following parturition
J. Anim. Sci. 32, Suppl. I, 1 - 16
- Wallach E.E., DeCherney A.H., Russ D., Duckett G., Celso-Ramon G.
und Root A.W. (1973)
Episodic secretion of LH and FSH after ovariectomy;
secretory patterns in response to estrogen and progesterone
Obstet. Gynecol. 41, 227 - 233

Wallen Lawrence Z. und van Dyke H.B. (1931)

The gonad-stimulating substances of the anterior lobe of the
pituitary body and of pregnancy-urine

J. Pharmacol. Exp. Therap. 43, 93 - 124

Warberg J., Eskay R.L. und Porter J.C. (1976)

Prostaglandin-induced release of anterior pituitary hormones:
structure activity relationships

Endocrinology 98, 1135 - 1141

Wettemann R.P., Hafs H.D., Edgerton L.A. und Swanson L.V. (1972)

Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine
estrous cycle

J. Anim. Sci. 34, 1020 - 1024

Wilfonger W.W., Brinkley H.J. und Young E.P. (1973)

Plasma FSH in the estrous cycle of the pig

J. Anim. Sci. 37, 333

Yanaihara N., Hashimoto T., Yanaihara C., Tsuji K., Kenmodi Y.,
Ashizawa F., Kaneko T., Oka H., Saito S., Arimura A. und Schally A.V.
(1972)

Synthesis and biological evaluation of analogs of luteinizing
hormone-releasing hormone (LH-RH) modified in position 2,3,4,
or 5

Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 64 - 73

Zeilmaker G.H. und Carlsen R.A. (1962)

Experimental studies on the effect of ergocornine methanesulphonate
on the luteotrophic function of the rat pituitary gland

Acta endocr. (Kbh.) 41, 321 - 335

- Zelznik A.J., Midgley A.R.Jr. und Reichert L.E. Jr. (1974)
Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of
human chorionic gonadotropin following treatment with
follicle-stimulating hormone in vivo
Endocrinology 96, 818 - 825
- Zolman J. und Convey E.M. (1973)
GnRH: effect of serum FSH and androgens in bulls
J. Anim. Sci. 37, 334 - 335
- Zondek B. und Aschheim S. (1927)
Das Hormon des Hypophysenvorderlappens
I. Testobjekt zum Nachweis des Hormons
Klin. Wschr. 6, 248 - 252
- Zondek B. (1928)
Die Darstellung des weiblichen Sexualhormons aus dem Harn,
insbesondere aus dem Harn von Schwangeren
Klin. Wschr. 7, 485 - 486
- Zondek B. (1930 a)
Über die Hormone des Hypophysenvorderlappens
I. Wachstumshormon, Follikelreifungshormon (Prolan A),
Luteinisierungshormon (Prolan B), Stoffwechselhormon?
Klin. Wschr. 9, 245 - 248
- Zondek B. (1930 b)
Über die Hormone des Hypophysenvorderlappens
IV. Darstellung des Follikelreifungshormons (Prolan A)
- Methodik der klinischen Harnanalyse zum Nachweis des
Prolan
Klin. Wschr. 9, 1207 - 1209

7. TABELLENANHANG

Versuchstiere, Alter, Rasse, Versuch, Standort und Anzahl der gewonnenen Blutproben.

Folgende Abkürzungen wurden dabei verwendet.

Bu	Bulle
K	Kuh
Ka	Kalbin
mK	männliches Kalb
wK	weibliches Kalb
B	Braunvieh
F	Höhenfleckvieh
S	Schwarzbuntes Niederungsvieh
J	Jahr
Mo	Monat
Tge	Tage

Tier		Alter	Rasse	Versuch	Standort	Anzahl Blutproben
Gilch	Bu	2 J	B	FSH-Halbwertszeit	Veitshof	44
7364594	Ka	1,5 J	B	Östrogeninfusion	"	85
7364596	Ka	1,5 J	B	"	"	85
Lado	Bu	2 J	B	"	"	24
Kabine	Bu	2 J	B	"	"	49
Kaliro	Bu	2 J	B	"	"	43
Bulli	Bu	1,5 J	F	Progesteroninfusion	"	43
Kabine	Bu	2 J	B	"	"	23
Kaliro	Bu	2 J	B	"	"	68
Bruni	K	4 J	B	Futterentzug	"	35
Adria	K	8 J	S	"	"	35
Kaliro	Bu	0-19 Mo	B	Pubertät	"	245
Kabine	Bu	0-19 Mo	B	"	"	243
Nydo	Bu	0-24 Mo	B	"	"	292
Lado	Bu	0-21 Mo	B	"	"	279
Roki	Ka	0-16 Mo	B	"	"	199
Roschli	Ka	0-13 Mo	B	"	"	151
Kakwi	Ka	0-13 Mo	B	"	"	144
Rokpe	Ka	0-12 Mo	B	"	"	165
Kalma	Ka	0-13 Mo	B	"	"	172
523	Bu	4- 9 Mo	F	"	Wildschwaige	39
526	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	38
531	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	39
532	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	39
533	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	39
536	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	39
541	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	39
544	Bu	3- 8 Mo	F	"	"	39

Tier	Alter	Rasse	Versuch	Standort	Anzahl Blutproben
Roschli K	4 J	B	Brunstzyklus	Veitshof	103
Kakwi K	5 J	B	"	"	134
Roki K	4 J	B	"	"	183
Kalidel K	9 J	B	"	"	117
Adria K	8 J	S	"	"	123
Thaiga K	4 J	F	"	Hirschau	271
Rokpe Ka	1,5 J	B	"	Veitshöf	101
Roschli Ka	1,5 J	B	"	"	90
Roki Ka	1,5 J	B	"	"	85
Kalma Ka	1,5 J	B	"	"	134
Kakwi Ka	1,5 J	B	"	"	96
Berta K	7 J	S	"	"	74
Dora Ka	1,5 J	B	"	"	94
Evi Ka	1,5 J	S	"	"	148
Fanni K	3 J	S	"	"	105
Gabi K	3 J	S	"	"	111
Helga K	4 J	S	"	"	148
Irma K	5 J	S	"	"	205
Joli Ka	2 J	S	"	"	149
Kati Ka	2 J	S	"	"	206
726659 Ka	1,5 J	B	"	"	28
7278991 Ka	1,5 J	B	"	"	22
7266571 Ka	1,5 J	B	"	"	28

Tier	Alter	Rasse	Versuch	Standort	Anzahl Blutproben
Adria	K	7 J	S	Trächtigkeit/Geburt Veitshof	349
Bruni	K	5 J	B	" "	348
Alante	K	8 J	F	" post- Hirschau	415
Pola	K	8 J	F	" partum- "	394
Zilla	K	14 J	F	" Periode "	231
Thaiga	K	4 J	F	" "	338
Zarte	Ka	2 J	F	" "	44
Wanda	K	3 J	F	Episodische Veitshof	120
Peppa	K	3 J	F	Schwankungen "	92
Ciba	Ka	2 J	B	" "	200
Korona	Ka	2 J	B	" "	192
Kathl	Ka	2 J	B	" "	136
Kaliro	Bu	4 J	B	" "	132
Gilch	Bu	2 J	B	" "	192
Gimpel	mk	1/4 J	B	" "	68
Isa	wk	4 Wo	B	" "	32
Nora	wk	4/8 Wo	B	" "	66
Karola	wk	8 Wo	B	" "	33
Kleva	wk	20/40 Wo	B	" "	66
Zitta	wk	20 Wo	B	" "	33
Klara	wk	40 Wo	B	" "	33
Kaiser	mk	4/8/20 Wo	B	" "	97
Zar	mk	8 Wo	B	" "	33
Gerd	mk	20/40 Wo	B	" "	66
Gilch	mk	40 Wo	B	" "	33
Klara	wk	36.-38. Wo	B	" "	45
Kleva	wk	35./36. Wo	B	" "	46
Karola	wk	8./ 9. Wo	B	" "	40
Nora	wk	8./ 9. Wo	B	" "	41

Tier	Alter		Rasse	Versuch	Standort	Anzahl Blutproben
Ciba	Ka	1 J	B	GnRH i.v.	Veitshof	29
Nany	Ka	2 J	B	"	"	35
Kapi	K	3,5 J	B	"	"	50
Ro ki	K	7 J	B	"	"	45
Roschli	Ka	2 J	B	"	"	44
Bulli	Bu	4 J	F	"	"	42
Rojo	K	12 J	B	"	"	50
Kalidip	K	12 J	B	GnRH i.m.	"	72
Kalma	Ka	2 J	B	"	"	36
Berta Laro	K	3 J	B	"	"	42
Bella	Ka	2 J	B	"	"	85
Laro	K	3,5 J	B	"	"	51
Bruni	K	6 J	B	"	"	369
Kaliro	Bu	2 J	B	"	"	188
Kabine	Bu	2 J	B	"	"	316
Edda	Ka	12-14 Mo	B	GnRH Zyklusabhängigkeit	"	36
Ciba	Ka	"	B	"	"	36
Aida	Ka	"	B	"	"	11
Deda	Ka	"	B	"	"	24
Rita	Ka	"	B	"	"	23
Sepia	K	3 J	F	"	"	12
Susi	Ka	1,5 J	B	GnRH 'Gelbkörper-	"	106
Roschli	Ka	2 J	B	"Enukleation	"	35
Rocki-M.	Ka	2 J	B	"	"	43
Zenzi	Ka	1,5 J	B	"	"	84
Kabine	K	6 J	B	GnRH post partum	"	60
Karo	K	3 J	B	"	"	47
Kalipri	K	4 J	B	"	"	42
Nydo	K	4,5J	B	"	"	54
Kakro	K	5 J	B	"	"	60

Tier	Alter	Rasse	Versuch	Standort	Anzahl Blutproben
Kleva	wK 11-230Tge	B	GnRH Altersabhängig-	Veitshof	117
Klara	wK 78-352Tge	B	" keit	"	156
Karola	wk 15-396Tge	B	"	"	68
Nora	wk 10-391Tge	B	"	"	68
Zar	mK 19-285Tge	B	"	"	47
Gerd	mK 19-283Tge	B	"	"	154
Gilch	mK 30-295Tge	B	"	"	162
7364591	Ka 1 J	B	GnRH Analog	"	44
7364592	Ka 1 J	B	"	"	44
7364593	Ka 1 J	B	"	"	22
7364594	Ka 1 J	B	"	"	22
7364596	Ka 1 J	B	"	"	22
7364902	Ka 1 J	B	"	"	22
7364905	Ka 1 J	B	"	"	22
7364906	Ka 1 J	B	"	"	44
7364908	Ka 1 J	B	"	"	68
7364909	Ka 1 J	B	"	"	68
7364910	Ka 1 J	B	"	"	68
3110602	Ka 1 J	B	"	"	36
7332990	Ka 1 J	B	"	"	66
205083	Ka 1 J	B	"	"	22
205089	Ka 1 J	B	"	"	22

Tier		Alter	Rasse		Standort	Anzahl Blutproben
Kaliro	Bu	3 J	B	TRH-Injektion	Veitshof	40
Bulli	Bu	4 J	F	"	"	37
Kakdon	K	4 J	B	"	"	30
Kaligor	K	12 J	B	"	"	30
Roci	K	8 J	B	"	"	41
Roja	K	4 J	B	"	"	40
Ciba	Ka	1,5 J	B	Prostaglandin-Analog	"	43
Edda	Ka	1,5 J	B	"	"	48
Xanta	K	3,5 J	F	"	"	44
Uta	K	3,5 J	F	"	"	41
Vroni	K	3,5 J	F	"	"	42
Gilla	Ka	2 J	B	"	"	48
Kapmon	K	5 J	B	CB-154-Injektion	"	32
Kakwi	K	9 J	B	"	"	65
Kalidel	K	9 J	B	"	"	106
Kakwi	K	9 J	B	"	"	57
Rojo	K	5 J	B	"	"	100
176	Ka	1,5 J	F	Superovulation	Neustadt/	44
185	Ka	1,5 J	F	"	Aisch	44
187	Ka	1,5 J	F	"	"	44
194	Ka	1,5 J	F	"	"	44
195	Ka	1,5 J	F	"	"	44

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg möchte ich für die Überlassung des Themas, seine zahlreichen Anregungen und Diskussionen sowie für die Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut meinen besonderen Dank sagen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Priv. Doz. Dr. D. Schams für die Einarbeitung in die Methodik der radioimmunologischen Bestimmung von Proteohormonen, für seine stete Kritik, Ratschläge und Diskussionen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, die mir durch ihre Hilfestellungen die Arbeit wesentlich erleichtert haben, gilt mein Dank, insbesondere Frau E. Eschenbach, Frau H. Huber, Frä. I. Ranner, Herrn A. Kronberger und Herrn J. Oberpriller für seine Ausdauer und Genauigkeit bei der Anfertigung von Graphiken und Photos.

Die Versuche wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

LEBENS LAUF

- 30.11.1947 geboren in Wildberg, Kreis Ostallgäu, als
zweites Kind des Werkzeugmachers Karl
Schallenger und der Lehrerin Ida
Schallenger, geb. Wagner
- 1954 - 1958 Volksschule Biessenhofen
- 1958 - 1967 Staatliches Gymnasium Kaufbeuren, Abschluß
mit der Reifeprüfung des mathematisch-
naturwissenschaftlichen Zweiges
- WS 1967/68 - Studium der Tiermedizin an der Universität
WS 1972/73 München
- Mai 1973 Bestellung als Tierarzt
Beginn der Arbeiten zu vorliegender Dissertation
am Institut für Physiologie der Süddeutschen
Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
der Technischen Universität München in Freising-
Weihenstephan
- Sept. 1973 wissenschaftliche Hilfskraft
- ab Juli 1974 wissenschaftlicher Angestellter an obigem Institut
- Juli-Sept. 1974 Gastaufenthalt am Department of Chemical Pathology,
The Royal Hospital of Saint Bartholomew, London
- Sept. 1975 Heirat mit der Tierärztin Uta Pottiez

